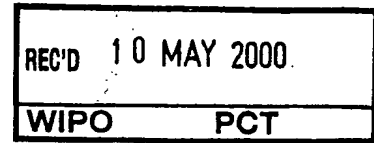


**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung****09/913927**

Die Herren Privat-Dozent Dr. Ulrich Schubert in Uhlstädt/Deutschland,  
 Dr. Peter Henklein in Berlin/Deutschland und Dr. Victor Wray in Wolfen-  
 büttel/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung synthetischer Vpr-Peptide des Humanen Immun-  
 defizienzvirus Typ 1 (HIV-1) zur Entwicklung von therapeuti-  
 schen und diagnostischen Reagenzien"

am 19. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
 lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
 A 61 K 49/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. April 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Brand



Aktenzeichen: 199 08 766.0

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft neue, synthetisch (s) hergestellte Vpr-Proteine, ihre biologischen Aktivitäten sowie ihre antigenen und physikochemischen Eigenschaften, die denen von natürlichen, in HIV-infizierten Zellen exprimierten viralen Vpr ähnlich oder identisch sind. Damit wird eine Methode beschrieben, mit der sVpr-Proteine in praktisch unbegrenzter Menge, mit hoher Reinheit und unter ökonomisch vertretbaren Bedingungen für die Entwicklung von neuartigen antiviralen Reagenzien und serologischen Testsystemen verfügbar gemacht werden.

Anwendungsgebiete sind - neben der HIV-Grundlagenforschung und der Strukturanalyse von HIV-Systemen - die Peptidchemie, der Aufbau von Testsystemen zum Screenen von potentiellen Vpr-Antagonisten, die Etablierung von Zellkultur- und Tiermodellen zur Untersuchung der Pathomechanismen von Vpr, die Entwicklung von serologischen Testmethoden, insbesondere eines Vpr-Antigen-ELISA und die *in vitro* Assemblierung von neuartigen Vektoren für den Einsatz bei Gentransfermethoden in der Gentherapie.

# Verwendung synthetischer Vpr-Peptide des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) zur Entwicklung von therapeutischen und diagnostischen Reagenzien

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft den Einsatz von synthetischen Peptiden des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) zum Zweck der Etablierung neuartiger Testmethoden in der serologischen Diagnose und Überwachung von HIV-1-infizierten Patienten, der Aufklärung der molekularen Struktur und Wirkungsweise dieses sowohl für die Virusreplikation als auch für die viralen Pathomechanismen wesentlichen Virusproteins. Basierend auf den dabei gewonnenen Erkenntnissen über seine molekularen und physikochemischen Eigenschaften zusammen mit der Verwendung von neuartigen synthetischen Peptiden, die entweder Teil oder Gesamtsequenzen von HIV-1 Vpr darstellen, werden Prinzipiellösungen für neuartige antivirale Strategien zum Einsatz in der Therapie und Behandlung von HIV-Infektionen entworfen. Darüber hinaus werden die neuartigen Produkte in Form von Vpr-Peptiden für die Etablierung von Gentransfer-Methoden in der Gentherapie angewendet.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik:

### 1.1. Einleitung

#### 1.1.1. Genomorganisation von Retroviren

#### 1.1.2. Replikationszyklus von HIV

#### 1.1.3. Bedeutung akzessorischer Virusgenprodukte im Replikationszyklus

#### 1.1.4. Das akzessorische Regulatorprotein Vpr

### 1.2. Analyse der biologischen Funktionen von Vpr

#### 1.2.1. Bedeutung von Vpr *in vivo* für die Pathogenese von HIV-Infektionen

#### 1.2.2. Vpr unterstützt die Virusreplikation *in vitro*

#### 1.2.3. Vpr induziert Zelldifferenzierung und Zellzyklusarrest

#### 1.2.4. Nuklearer Transport und Funktion(en) von Vpr im Zellkern

#### 1.2.5. Wechselwirkung von Vpr mit zellulären Faktoren

#### 1.2.6. Vpr reguliert die Wirkung von Glucocorticoid -Hormonen

#### 1.2.7. Einbau von Vpr in Viruspartikel

### 1.3. Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Vpr

#### 1.4. Chemische Synthese und Aktivitäten von Vpr-Peptiden

#### 1.5. Expression und Aktivitäten von rekombinantem Vpr

##### 1.5.1. Expression von Vpr in Insektenzellen

##### 1.5.2. Expression von Vpr in Escherichia (E.) coli

##### 1.5.3. Patentliteratur

## 1.1. Einleitung

In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat die Pandemie des erworbenen Immundefizienzsyndroms (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) Millionen von HIV-infizierten Menschen mit einer heimtückischen, multisystemischen und ultimativ unheilbaren Krankheit konfrontiert. Ungeachtet des relativ umfangreichen Detailwissens über die genomische Organisation, die Regulation der Virusgenexpression sowie die biologischen Funktionen der meisten HIV-Proteine ist die Kenntnis über die Replikation und Ausbreitung des Erregers *in vivo* wie auch über die konkreten Pathogenitätsmechanismen nach wie vor nur lückenhaft. Neue Hoffnung für die Identifizierung von bislang unbekannten Faktoren, welche die klinische Progression der Krankheit auslösen und/oder fördern, entsteht mit der Evaluierung "Langzeitüberlebender" (long term survivors) einer HIV-Infektion. Ein Schwerpunkt dabei ist die Identifizierung und Charakterisierung virusspezifischer Pathogenitätsfaktoren. Von besonderem Interesse sind hier die Nichtstrukturproteine des Virus, welche regulatorische Funktionen im Replikationszyklus von HIV ausüben (Literaturverzeichnis zum Stand der Technik hinter den Ausführungsbeispielen).

### 1.1.1. Genomorganisation von Retroviren

Die Familie der Retroviren, zu welcher auch HIV gehört, zählt zu der großen Gruppe von eukaryotischen retrotransposablen Elementen (Doolittle et al., 1989, 1990). Diese zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase RNA-Genome in DNA-Intermediate umzuschreiben (Doolittle et al., 1989). Retroviren werden in fünf Subfamilien untergliedert: (i) Spumaviren; (ii) Mammalian C-Typ Oncoviren; (iii) BLV (Bovine Leukemia Virus)/HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) Leukämieviren; (iv) eine heterogene Gruppe aus RSV (Rous Sarcoma Virus), A, B und D-Typ Viren; sowie (v) Lentiviren (Doolittle et al., 1990; Martin, 1993). Wie der Name umschreibt, verursachen Lentiviren lang andauernde und meist unheilbare Krankheiten. Lentiviren replizieren vorrangig in Lymphozyten und ausdifferenzierten Makrophagen. Replikationskompetente Retroviren beinhalten mindestens drei charakteristische Gene: *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol* (Polymerase) und *env* (Hüllproteine). Außer Struktur- und enzymatisch aktiven Virusproteinen kodieren verschiedene Retroviren zusätzliche, in der Regel kleine Proteine mit regulatorischen Funktionen. Neben HIV zählen zu der Subfamilie der Lentiviren SIV (Simian Immunodeficiency Virus), EIAV (Equine Infectious Anemia Virus), BIV (Bovine Immunodeficiency Virus), FIV (Feline Immunodeficiency Virus) und Visna Virus (Doolittle et al., 1990). HIV wiederum wird in die zwei Subtypen HIV-1 und HIV-2 (Clavel et al., 1987) untergliedert. Bei vergleichbarer Genomorganisation ist HIV-1 durch das *vpu* Gen (Strebel et al., 1988; Cohen et al., 1988) und HIV-2 durch das *vpx* Gen (Henderson et al., 1988) gekennzeichnet.

### 1.1.2. Replikationszyklus von HIV

Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit der Bindung des Virus an verschiedene Zellrezeptoren,

6  
unter denen das Glykoprotein CD4 als der primäre Rezeptor fungiert. Der Viruseintritt erfolgt durch pH-unabhängige Membranfusion, gefolgt von dem "uncoating" der Viruspartikel im Zytosol. Das virale RNA-Genom wird mittels enzymatischer Aktivitäten von Reverser Transkriptase (RT), RNase H und Polymerase in doppelsträngige DNA umgeschrieben, welche dann in Assoziation mit dem Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert und als Provirusgenom in chromosomale DNA mittels viraler Integrase eingebaut wird. Nach Transkription und Translation werden Gag/Gag-Pol-Polypoteine sowie Hüllproteine an die Zellmembran transportiert, wo die Assemblierung von Virionen erfolgt. Nach Budding und Abschnürung reifen Viruspartikel durch proteolytische Prozessierung der Gag/Gag-Pol-Polypoteine (für Review siehe Martin, 1993).

#### 1.1.3. Bedeutung akzessorischer Virusgenprodukte im Replikationszyklus von HIV-1

Zusätzlich zu den Prototyp-Retrovirusgenen *gag*, *pol* und *env* kodiert HIV-1 weitere Gene: *tat* und *rev* sind essentiell für Virusreplikation; Tat ist der Haupttransaktivator des Viruspromoters (Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986) und Rev übt posttranskriptionelle Funktionen aus, indem es den Transport von nicht gespleißter *gag/pol* sowie einfach gespleißter *vif*, *vpr* und *vpu/env* mRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma reguliert (Malim et al., 1989; für Review siehe Martin, 1993 und Trono, 1995). Dagegen sind *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* für die Virusreplikation in Zellkultur nicht unbedingt erforderlich und werden daher gewöhnlich als "akzessorische" Gene bezeichnet. Obwohl in den vergangenen Jahren die akzessorischen Gene von HIV-1 intensiv untersucht wurden, ist das Wissen über deren molekulare Mechanismen nur lückenhaft. Kontrovers zu der extrem hohen Mutations- und der dadurch bedingten hohen Evolutionsrate von Retroviren (insbesondere für HIV) steht die Beobachtung, daß Deletionen dieser akzessorischen Gene nur subtile Veränderungen des Phänotyps in Zellkulturen hervorrufen und in der Regel die Replikation solcher Mutanten *in vitro* nicht wesentlich beeinträchtigen. Tatsächlich mehren sich jedoch Hinweise in der Literatur, wonach diese Proteine die Infektionsausbreitung und die Krankheitsprogression einzelner Viren *in vivo* wesentlich bestimmen. Weiterhin haben Experimente *in vitro* gezeigt, daß einzelne dieser akzessorischen Proteine in bestimmten Zellkulturen, insbesondere in kultivierten primären humanen Monozyten/Makrophagen, eine essentielle Funktion für die Virusreplikation ausüben.

#### 1.1.4. Das akzessorische Regulatorprotein Vpr

Das Gen *vpr* wurde erstmals 1987 als ein kleiner offener Leserahmen im Genom des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) beschrieben und mit dem Buchstaben "R" bezeichnet (Wong-Staal et al., 1987). Das entsprechende Genprodukt, das etwa 15 kDa große Vpr-Protein, ist immunogen und induziert in der Mehrheit aller HIV-1-Infizierten anti-Vpr-Seroantikörper (Wong-Staal et al., 1987). Das *vpr* Gen ist unter allen bekannten Isolaten von HIV-1 und HIV-2 wie auch den Affen-Immundefizienzviren (SIV) konserviert und wird daher auch als das Lentivirusprotein Vpr bezeichnet. Das 96 Aminosäure große Vpr-Protein von HIV-1 zeigt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu

dem für HIV-2 und SIV spezifischen akzessorischen Protein Vpx (Tristem et al., 1992). Es wird daher angenommen, daß Vpx durch Genduplikation von Vpr während der Evolution von HIV-2/SIV Viren entstanden ist.

Vpr besitzt diverse biologische Aktivitäten wie zum Beispiel: Oligomerisierung, Lokalisation im und Transport des viralen Präintegrationskomplex/es zum Zellkern, Transkriptionsaktivierung von HIV-1 und heterologen Viruspromotoren, Induktion von Zelldifferenzierung und Zellzyklusarrest, Bindung und Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären Proteinen, insbesondere dem Glucocorticoidrezeptor (GR) und Verstärkung der Wirkung von Steroidhormonen (zusammengefaßt in Emerman, 1996 und Levy et al., 1994).

## 1.2. Analyse der biologischen Funktionen von Vpr

### 1.2.1. Bedeutung von Vpr *in vivo* für die Pathogenese von HIV-Infektionen

Studien im Tiermodell zeigten an einem Beispiel, daß Vpr für die Entwicklung von AIDS-ähnlichen Symptomen in SIV-infizierten Rhesusaffen erforderlich ist, beziehungsweise daß Punktmutationen im *vpr* Gen im Verlauf der Infektionsausbreitung *in vivo* zu funktionellem Vpr revertieren (Lang et al., 1993). Andererseits haben ähnliche Untersuchungen erbracht, daß AIDS in SIV<sub>mac239</sub>-infizierten Rhesusaffen unabhängig der Expression von Vpr und Vpx auftrat (Gibbs et al., 1995). Aufgrund der Annahme, daß Vpx von HIV-2 und SIV durch Genduplikation von Vpr in der Evolution der Primaten Lentiviren entstand (Tristem et al., 1992), wäre es möglich, daß Vpx die Funktion von Vpr komplementieren könnte. Tatsächlich verhindern die Doppelmutationen in *vpx* und *vpr* von SIV<sub>mac239</sub> die AIDS-Progression (Gibbs et al., 1995).

Ähnliche Anhaltspunkte für eine Funktion von Vpr *in vivo* erbrachten molekulare und phylogenetische Untersuchungen des *vpr* Gens von HIV-1-Isolaten, gewonnen aus Langzeit-Überlebenden ("long-term survivor") Probanden, welche mehr als 13 Jahre ohne das Auftreten von AIDS-ähnlichen Erkrankungen und mit stabilem CD4<sup>+</sup> T-Zell Level überlebten (Wang et al., 1996). Ein Großteil der *vpr* Gene zeigte Mutationen, insbesondere innerhalb des den C-Terminus kodierenden Bereiches. Diese basische Region von Vpr soll für den durch Vpr induzierten G2-Zellzyklusarrest verantwortlich sein (DiMario et al., 1995). Im Unterschied dazu wurden keine Mutationen in der Vergleichsgruppe von AIDS-Patienten ermittelt.

### 1.2.2. Vpr unterstützt die Virusreplikation *in vitro*

Vpr ist das einzige akzessorische Protein, welches in signifikanten Mengen und durch einen spezifischen Mechanismus aktiv in Viruspartikel eingebaut wird (Cohen et al., 1990a,b; Yu et al., 1990). Diese Tatsache führte zu der Vermutung, daß die Wirkung von Vpr frühzeitig im HIV Replikationszyklus erfolgt, unmittelbar nach Membranfusion und "uncoating" des eindringenden Viruspartikels. Begründet ist diese Annahme weiterhin durch die Tatsache, daß Vpr im Viruspartikel offensichtlich keinen Einfluß auf die Morphologie und die Infektiosität von HIV-Virionen ausübt.

Tatsächlich haben *in vitro* Studien gezeigt, daß Mutationen in *vpr* die Virusreplikation und die Zytopathogenität von HIV-1, HIV-2 und SIV in primären CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und transformierten T-Zelllinien reduzieren (Ogawa et al., 1989; Shibata et al., 1990a,b; Westervelt et al., 1992). Es liegen sogar einzelne Berichte vor, die darauf hinweisen, daß Mutationen in *vpr* von HIV-2 die Infektion von primären Monozyten/Makrophagen vollständig verhindern können (Hattori et al., 1990).

Andere Studien über eine mögliche Anwendung von "anti-Vpr-Drogen" zeigten, daß *vpr* spezifische antisense Konstrukte, welche Phosphorothioat Deoxynucleotide enthalten, die HIV-1-Virusreplikation in Makrophagen unterdrücken können (Balotta et al., 1993).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Vpr nicht essentiell für die Virusreplikation in den meisten etablierten permanenten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien ist. Weiterhin hat Vpr nur einen geringen oder gar keinen Effekt auf die HIV-Infektion von aktivierten, sich schnell teilenden peripheren Blutlymphozyten ("peripheral blood mononuclear cells, PBMC") (Dedera et al., 1989). Jedoch unterstützt und/oder ermöglicht Vpr die Virusreplikation in ausdifferenzierten, sich nicht mehr teilenden primären humanen Monozyten/Makrophagen (Bukrinsky et al., 1993; Heinzinger et al., 1994; Westervelt et al., 1992; Hattori et al., 1990; Connor et al., 1995). Diese Tatsache wird dadurch begründet, daß Vpr für den Import des viralen Präintegrationskomplexes in den Zellkern von sich nicht mehr teilenden Zellen notwendig ist und dadurch HIV unabhängig von der Zellmitose ausdifferenzierte Zellen infizieren kann (Heinzinger et al., 1994; Fletcher et al., 1996).

### 1.2.3. Vpr induziert Zelldifferenzierung und Zellzyklusarrest

~~Erste Untersuchungen zu diesem Thema zeigten, daß Vpr unabhängig von anderen viralen Faktoren in~~ Tumorzelllinien Zellwachstum und Zellzyklus sowie terminale Differenzierungsprozesse beeinflusst (Levy et al., 1993). Nachfolgende Studien klärten, daß Vpr die Proliferation von mit HIV-1 infizierten Zellen durch Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase stört (Di Marzio et al., 1995; He et al., 1995; Re et al., 1995; Rogel et al., 1995). Der Arrest im Übergang von G2 zur mitotischen (M)-Phase unmittelbar nach Duplikation der chromosomalen DNA resultiert allgemein im Zellwachstumsstop und Apoptose. Dieses Phänomen kann die allgemeine Beobachtung erklären, daß *vpr*<sup>+</sup> Viren generell keine chronische Infektion in T-Zellen etablieren können, während *vpr*-defiziente Viren Lang-Zeit-Kulturen von chronisch infizierten Zellen ermöglichen (Rogel et al., 1995). Vpr selbst hat keinen Effekt auf die zytopathischen Prozesse einer akuten HIV-Infektion.

Es wird angenommen, daß der durch Vpr induzierte Zellzyklusarrest einen generellen zellulären Pathway involviert, da dieses Phänomen nicht nur in humanen Zelllinien, sondern auch in nicht-humanen Primatenzellen und in primitiven Eukaryoten wie zum Beispiel Hefen auftritt (Planelles et al., 1996; Zhao et al., 1996; Stivahtis et al., 1997).

Der Effekt von Vpr auf Zellteilung und Zelldifferenzierung kann ebenfalls durch lösliches, extrazelluläres Vpr ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß Vpr in Konzentrationen von bis zu 10 ng/ml im Serum wie auch im zerebalen Spinalliquor von HIV-Infizierten

9

auftritt (Levy et al., 1994). Solcherart "Serum-Vpr" vermag - isoliert aus peripherem Blut HIV-1-infizierter Probanden - eine latente HIV-1-Expression in T-Zelllinien wie auch in kultivierten PBMC zu aktivieren. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß Vpr die Latenz von HIV *in vivo* reguliert. Tatsächlich korreliert der Spiegel von Serum-Vpr mit dem Grad der p24-Antigenämie sowie der Krankheitsprogression einzelner Infizierter (Levy et al., 1995). Die Präsenz von löslichem Serum-Vpr im peripheren Blut sowie in Spinalliquor HIV-Infizierter wird durch die Lyse sowie durch die immunologische Desintegration von Viruspartikeln erklärt. Es wird angenommen, daß Serum-Vpr zu den bekannten pathologischen Erscheinungen im Zusammenhang mit einer HIV-Infektion beiträgt, einschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellverlust und neurologischen Symptomen. Ähnlich der Wirkung von Serum-Vpr kann ebenfalls rekombinantes, in Insektenzellen hergestelltes Vpr in Konzentrationen von 0.1 bis 10 ng/ml die Virusreplikation in akut wie auch latent infizierten Zelllinien und primären Zellen stimulieren und dadurch den Defekt von *vpr*-defizienten Viren *in trans* komplementieren (Levy et al., 1995).

#### 1.2.4. Nuklearer Transport und Funktion(en) von Vpr im Zellkern

Die für Lentiviren spezifische Fähigkeit der Virusreplikation in sich nicht mehr teilenden Zellen, wie zum Beispiel ausdifferenzierten Makrophagen, hängt im Wesentlichen von dem Transport des viralen Genoms im Verbund des Präintegrationskomplexes in den Zellkern ab, ein Prozeß, der unabhängig vom Aufbruch der Kernmembran im Verlauf der Mitose erfolgt. Bestandteil des HIV-Präintegrationskomplexes sind virale Nukleinsäuren, Enzyme wie Integrase und Reverse Transkriptase, das Nukleokapsidprotein NCp7, das Matrixprotein p17<sup>MA</sup> sowie Vpr. Bisher sind die Mechanismen ungeklärt, welche den nuklearen Transport von Vpr regulieren, insbesondere da Vpr über keines der bekannten "nuclear localization signals" (NLSs) verfügt. Ebenfalls sind die biologische Bedeutung der Bindung von Vpr mit dem Glucocorticoidrezeptor Typ II (GR-II) (Refaeli et al., 1995) sowie die Mechanismen des Vpr-induzierten G2-Arrestes noch unverstanden. Weiterhin bleibt zu klären, ob die unspezifische Aktivierung von HIV-1 und anderer viraler Promotoren von HTLV-1, EBV und CMV (Cohen et al., 1990) für diese Funktionen von Vpr im Zellkern von Bedeutung sind. Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß ein 20 Aminosäure langes Peptid aus der negativ geladenen N-terminalen Domäne von Vpr ausreichend ist, um den Transport von Rinderserumalbumin in den Zellkern zu bewirken (Karni et al., 1998).

Im Zellkern sollen Komplexe, bestehend aus Vpr und NCp7, die Phosphatase 2A<sub>0</sub> aktivieren und dadurch G2-Arrest auslösen (Tung et al., 1998). Die Proteinphosphatase 2A<sub>0</sub> fungiert als ein Inhibitor im Übergang von G<sub>0</sub>- zur M-Phase im Prozeß der Zellteilung und beeinflusst darüber hinaus verschiedene andere zelluläre Prozesse.

#### 1.2.5. Interaktion von Vpr mit zellulären Faktoren

Da Vpr als Bestandteil des Präintegrationskomplexes elementare Prozesse der Zelle im Interesse der



10

Virusreplikation beeinflusst, war anzunehmen, daß dazu Vpr spezifische Verbindungen mit zellulären Faktoren eingehen sollte. Tatsächlich wurde eine Wechselwirkung von Vpr mit einem ca. 200 kDa großen Protein sowie mit einem 41 kDa zellulären Protein als Komplex mit dem humanen Glucocorticoidrezeptor Typ II (GR-II) beobachtet (Zhao et al., 1994; Refaeli et al., 1995). Weiterhin unterdrückt Vpr die T-Zellrezeptor-vermittelte Apoptose und T-Zellaktivierung (Aktivierung von Lymphokinexpression IL-2, IL-10, IL-12, TNF-alpha und IL-4) durch Beeinflussung von NF- $\kappa$ B Aktivität (Ayyavoo et al., 1997). In der gleichen Studie wurde gezeigt, daß sowohl Vpr als auch Glucocorticoide wie Dexamethasone und Hydrocortison die Zellteilung gleichermaßen blockieren, während der GR-Antagonist RU486 die Vpr-Wirkung wieder aufhob. Diese (Ayyavoo et al., 1997) und andere Studien (Rafaeli et al., 1995) unterstützen die Hypothese, daß der Vpr-vermittelte G2-Arrest ganz oder teilweise über den GR-vermittelten Pathway erfolgt.

Weiterhin soll Vpr mit der zweiten UBA (ubiquitin associated) Domäne des humanen DNA-Reparaturproteins HHR23A eine spezifische Wechselwirkung eingehen, welche eine drei-helix-Bündelstruktur bildet (Diekmann et al., 1998). Diese Wechselwirkung wiederum unterstützt den Vpr-induzierten G2 Zellzyklusarrest (Withers-Ward et al., 1997). Jedoch steht ein direkter Beweis für die Interaktion zwischen UBA und Vpr als auch für die Domäne in Vpr noch aus, welche an die 45 Aminosäure langen UBA Domäne bindet.

#### 1.2.6. Vpr reguliert die Wirkung von Glucocorticoid -Hormonen

Vpr tritt in direkte Wechselwirkung mit dem Glucocorticoidrezeptor sowie verschiedenen Transkriptionsfaktoren und kann dadurch, sozusagen als Co-Aktivator, die Wirkung von Glucocorticoiden in verschiedenen Zelllinien erhöhen (Kino et al., 1999). Es ist bekannt, daß Vpr ein LXXLL Motiv enthält, wie dieses ebenfalls in nuklearen Hormonrezeptoren auftritt. Steroidhormonrezeptor-Antagonisten, wie zum Beispiel RU 486, können die Aktivator-Funktion von Vpr wieder aufheben. Es wird angenommen, daß die Wirkung von Vpr als Glucocorticoid-Coaktivator zu einer erhöhten Glucocorticoid-Sensitivität und dadurch zur Pathogenese von AIDS beiträgt.

#### 1.2.7. Einbau von Vpr in Viruspartikel

Außer Nef und Vif, welche in geringer Molekülzahl eingebaut werden, ist Vpr das einzige akzessorische HIV-Protein, welches in signifikanten Mengen selektiv *via* direkter Wechselwirkung von Vpr mit der p6<sup>gag</sup> Domäne des Gag-Polypotein-Präkursors Pr55 und unabhängig von anderen viralen Faktoren im Prozeß der Virusassemblierung in reifende Virionen eingebaut wird (Cohen et al., 1990; Paxton et al., 1993; Lavalley et al., 1994; Kondo et al., 1995; Lu et al., 1995; Kondo und Göttinger, 1996). Die Bereiche von Vpr, welche für den Viruseinbau erforderlich sind, wurden bisher kontrovers definiert: Sowohl die N-terminale Region (Yao et al., 1995; Mahalingam et al., 1995, Lavalley et al., 1994; Kondo et al., 1995; Lu et al., 1995) als auch C-terminale Bereiche (Paxton et al., 1993) wurden dafür verantwortlich gemacht. Innerhalb von p6<sup>gag</sup> sind die Positionen 36-42 für diese Funktion

notwendig. Eine andere Schule ist dagegen der Auffassung, daß der Viruseinbau von Vpr durch Wechselwirkung von Vpr mit der NCp7 Domäne innerhalb des Pr55 Gag-Präkursors erfolgt, eine Aktivität, welche die Zink-Finger Region in NCp7 sowie die C-terminalen 16 Aminosäuren in Vpr erfordert (Rocquigny et al., 1997).

5

### 1.3. Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Vpr

Die bislang einzige *in vitro* charakterisierte biochemische Aktivität von Vpr ist die eines Kationen-selektiven Ionenkanals (Piller et al., 1996). Diese Arbeiten basieren auf der Annahme, daß die C-terminale Helix (Positionen 46 bis 71), welche Ähnlichkeiten zu der Bienengift-Komponente Melittin besitzt, als Transmembrananker eine Membranpore ausbildet. Tatsächlich konnte rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes Vpr in künstlichen planaren Lipidbilayern rekonstituiert werden. Dadurch wurde eine durch das Membranpotential regulierbare Ionenkanalaktivität ermittelt, deren Regulierbarkeit von der basischen C-terminalen Region abhängt, welche mit der negativ geladenen zytoplasmatischen Seite der Zellmembran in Wechselwirkung treten soll.

10

Es liegen Hinweise für Homooligomerisierung von Vpr vor: Ein rekombinantes Vpr-Fusionsprotein bildet oligomere Strukturen mit Molekulargewichten von >100 kDa (Zhao et al., 1994), eine Beobachtung, die bisher an viralen Vpr nicht bestätigt werden konnte.

Untersuchungen zur molekularen Struktur von Vpr wurden bislang durch zwei Gruppen mittels Sekundärstruktur-Analysen an kurzen Vpr-Peptiden durchgeführt: NMR-Studien an überlappenden Peptiden in wässrigem Trifluorethanol (TFE) sowie in Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Mizellen identifizierten alpha-helikale Regionen in den Vpr-Positionen 50-82. (Yao et al., 1998). Das Potential zur Helix-Bildung in der C-terminalen wie auch der N-terminalen Region von Vpr wurde zuvor von verschiedenen Autoren vorhergesagt (Mahalingam et al., 1995a,b; Yao et al., 1995; Wang et al., 1996). Neuere Studien mittels CD-Spektroskopie in TFE-haltigen Lösungen an 25 Aminosäure langen Peptiden (Luo et al., 1998) zeigten erste experimentelle Hinweise für die Existenz der N- und C-terminalen Helices in Vpr (Figur 1). Die Lösungsstruktur eines 45 Aminosäure langen Peptides Vpr52-96 wurde unlängst in 30% TFE mittels <sup>1</sup>H NMR bestimmt, dabei wurde eine amphipathische Helix in der Region 53 bis 78 definiert (Schüler et al., 1999).

20

25

Zahlreiche und zum Teil in ihrer Aussage kontroverse Mutationsanalysen haben versucht, die verschiedenen Primär- und Sekundärstrukturen einzelnen biologischen Aktivitäten von Vpr zuzuordnen (Mahalingam et al., 1995a-d, 1997; Wang et al., 1996; Nie et al., 1998; Di Marzio et al., 1995). Das bisherige Modell der Struktur- und Funktionsdomänen von Vpr ist in der Figur 1 zusammengefaßt.

30

### 1.4. Chemische Synthese von Vpr-Peptiden und deren biologische Wirkungen

Über die chemische Vollsynthese eines Vpr-Proteins wurde erstmals 1997 von Rocquigny und Mitarbeitern berichtet. Die Autoren beschrieben die Synthese eines 96 Aminosäuren langen Peptides, welches von dem Virusisolat HIV<sub>89,6</sub> (Collman et al., 1992) abstammt.

35

Es werden keine Angaben über die Reinheit sowie die physikochemischen Eigenschaften des Vpr-Peptides gegeben. Es wird lediglich mittels der Far-Westernblot-Technik gezeigt, daß SDS denaturiertes Vpr-Peptid mit dem viralen Nukleoprotein NCp7 des gleichen HIV-Isolates in Wechselwirkung tritt, ein Befund, welcher von keinen der zahlreichen anderen auf dem Vpr-Gebiet arbeitenden Gruppen beobachtet wurde. Wesentlicher Nachteil dieser Vpr-Synthese ist die Tatsache, daß für dieses Peptid keine der bisher beschriebenen biologischen Aktivitäten durch die Autoren gezeigt wurde. Insbesondere wird beschrieben, daß dieses Vpr-Peptid nicht an  $p6^{Gag}$  bindet, eine weithin akzeptierte Eigenschaft von Vpr (Paxton et al., 1993; Lavalley et al., 1994; Kondo et al., 1995; Lu et al., 1995; Kondo und Göttlinger, 1996). Darüber hinaus wird beschrieben, daß dieses Peptid keine Oligomere bildet, und es liegen Hinweise vor, daß dieses Peptid in rein wässrigem System unlöslich ist. Ebenfalls werden über die Ausbeute und die Synthesekapazität eines solchen Produktes keine Informationen erstellt.

Von dem gleichen Labor wird in einer weiteren Studie (Roques et al., 1997) ein Modell der Vpr-NCp7 Wechselwirkung vorgestellt, welches auf Strukturanalysen an Teilsequenzen dieser Peptide basiert. Die Daten dazu werden jedoch in dieser Arbeit nicht näher beschrieben.

Teilsequenzen von Vpr (Positionen 50-75, 50-82 und 59-86) wurden für NMR-Studien an synthetischen Peptiden eingesetzt (Yao et al., 1998). Eine andere Gruppe hat zwei 25 Aminosäure lange Peptide aus den Bereichen der vorhergesagten alpha-helikalen Domänen in Vpr mittels CD-Spektroskopie untersucht (Luo et al., 1998). Kurze, ca. 20 Aminosäurereste lange Peptide der C-terminalen Region von Vpr, welche das Motiv "H<sup>F</sup>/sRIG" enthalten, haben in einer Konzentration von 0.7 bis 3 mM zytotoxische Wirkung gegenüber verschiedenen Hefe-Stämmen wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und *Schizosaccharomyces pombe* (Macreadie et al., 1995, 1996, 1997).

Erhöhte Konzentration von bivalenten Kationen, insbesondere Magnesium und Kalzium, verhindern die Aufnahme der Vpr-Peptide und dadurch deren toxischen Effekt. Weiterführende Studien zeigten, daß ein C-terminales Vpr-Peptid (Positionen 71-82) die Permeabilisierung, eine Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials und letztendlich den Zelltod von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirkt (Macreadie et al., 1997). Schließlich wurden ähnliche toxische Effekte ebenfalls für Gesamt-Vpr demonstriert (Arunagiri et al., 1997). Dazu wurde das gleiche rekombinante GST-Vpr-Fusionsprotein eingesetzt, welches zuvor für Ionenkanalstudien an Vpr verwendet wurde (Piller et al., 1996). Jedoch berichten die Autoren von Problemen mit der Löslichkeit des rekombinanten Produktes in wässrigen Systemen.

## 1.5. Expression und Aktivitäten von rekombinanten Vpr

### 1.5.1. Expression von Vpr in Insektenzellen

Rekombinantes Vpr des Isolates HIV-1<sub>NL4.3</sub> wurde in Insektenzellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren exprimiert (Levy et al., 1995). Die Reinigung des Produktes erfolgte, lediglich durch Immunaффinitätschromatographie an immobilisiertem polyklonalem Antiserum, welches gegen die N-terminale Domäne von Vpr gerichtet war. Dazu wurden Zellkulturüberstände eingesetzt, da rekombinantes Vpr unspezifisch in das Kulturmedium sekretiert wird. Reinigungsstrategien für die

Produktion größerer Mengen an rekombinantem Vpr wurden nicht beschrieben. In den meisten Fällen wurden von den Autoren Vpr-haltige Zellkulturüberstände für biologische Tests verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, daß rekombinantes Vpr die Virusreplikation in PBMC und verschiedenen latent infizierten Monozyten- und T-Zelllinien aktiviert. Wesentliche Nachteile dieses Verfahrens sind:

- geringe Ausbeute und keine Möglichkeit zur Herstellung von mg-Mengen an hochreinem Produkt;
- rekombinantes Vpr wurde im Prozeß der Affinitätsreinigung mit Detergentien versetzt, wodurch Dialyse und Renaturierung notwendig wurden;
- Studien zu einer möglichen posttranslationalen Modifizierung von Vpr in Insektenzellen wurden nicht beschrieben;
- die Wirkung von rekombinanten Vpr in HIV-infizierten primären Monozyten / Makrophagen wurde nicht getestet.

#### 1.5.2. Expression von Vpr in *Escherichia (E.) coli*

Expression, Reinigung sowie biochemische Charakterisierung von rekombinantem Vpr wurden erstmals 1994 von Zhao und Mitarbeitern beschrieben. Dazu wurde die kodierende Sequenz des Vpr-Proteins des Isolates HIV-1<sub>89,6</sub> in *E. coli* als Fusionsprotein exprimiert. Zum Zweck der Reinigung und der Detektion wurde in diesem Verfahren C-terminal eine 25 Aminosäure lange Sequenz des heterologen FLAG-Epitopes fusioniert. Abgesehen von der Oligomerisierung wurden über biologische Aktivitäten des rekombinanten Produktes in dieser Arbeit keine Angaben gemacht. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß Vpr nicht in seiner authentischen Sequenz, sondern als Fusionsprotein exprimiert wird.

In einem weiteren Verfahren wurde Vpr des Isolates HIV-1<sub>HXB-2</sub> in *E. coli* als Glutathion S-Transferase(GST)-Fusionsprotein exprimiert (Piller et al., 1996). Nach einer Affinitätschromatographie an Glutathione-Agarose wurde Vpr durch Thrombin-Spaltung vom Fusionsanteil befreit. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß Vpr nach Spaltung eine starke Tendenz zur Aggregation besitzt und nicht in wässriger Lösung gehalten werden kann. So berichten zum Beispiel Arunagiri und Mitarbeiter (1997), daß mit diesen Verfahren hergestelltes rekombinantes Vpr nach Abspaltung des GST-Fusionsanteils unlöslich wurde und daher nur durch Beibehaltung des heterologen Fusionsanteil Vpr in wässrigen Systemen getestet werden konnte.

(Literaturverzeichnis hinter den Ausführungsbeispielen).

#### 1.5.3. Patentliteratur

In der Patentanmeldung WO 95/26361 (Azad, A.A., Macreadie, I.G., Arunagiri, C., 1995) werden biologisch aktive Peptidfragmente des Vpr-Proteins von HIV beschrieben; pharmazeutische Verbindungen, welche diese Peptide oder biologisch aktive Analoga davon enthalten; Antagonisten der Vpr-Peptide sowie pharmazeutische Verbindungen, welche diese Vpr-Antagonisten enthalten. Die chemische Synthese von Gesamt-Vpr-Protein spielt darin keine Rolle.

14

Gegenstand der WO 96/07741 (Cohen, E.; Bergeron, D.; Checroune, F.; Yao, X.-J.; Pignac-Kobinger, G., 1996) sind chimere Moleküle, bestehend aus Vpr von HIV-1 und Vpx von HIV-2, welche spezifisch in HIV-1/HIV-2-Viruspartikel eingebaut werden können und dort die strukturelle Organisation und funktionelle Integrität von Virionen stören. Sie sind jedoch für den Einsatz zur Genterapie von HIV-1/HIV-2-Infektionen ausgeschlossen.

In WO 96/08970 (Weiner, D.B.; Levy, D.N.; Refaeli, Y., 1996) werden Methoden zur Hemmung der Zellteilung und der Lymphozyten-Aktivierung unter Anwendung von Vpr-Proteinen, Fragmenten von Vpr oder Gensequenzen von Vpr genannt. Die chemische Synthese von Vpr-Proteinen spielt darin keine Rolle.

Die Verwendung von *vpr* Genen im Screening-Assay für anti-HIV-Arzneimittel wird in den US-Patenten 5721104 und 5639619 beschrieben, zur Bestimmung von HIV-2 in US 5580739, ein Vpr-Rezeptor-Protein in US 5780238.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, synthetische (s)Vpr-Proteine herzustellen, die biologische Wirksamkeit sowie die antigenen und physikochemischen Eigenschaften von sVpr-Proteinen zu demonstrieren und damit die Prinziplösung für deren Einsatz in vielfältigen Bereichen der HIV verwandten Grundlagenforschung, Therapie und Serodiagnose zu erstellen.

Die Aufgabe wurde erstens durch die Totalsynthese von sVpr1-96 von HIV-1<sub>NL4-3</sub> gelöst. Dieses Protein unterscheidet sich in 9 Aminosäure-Positionen von dem Protein, das zuvor von Rocquigny und Mitarbeitern (1997) beschrieben wurde. Somit besteht eine 10%-ige Divergenz zwischen den bereits beschriebenen (de Rocquigny et al., 1997) und dem mit der vorliegenden Erfindung erhaltenen Produkt, welches die Gesamt- und Teilsequenzen des Vpr-Proteins von HIV-1<sub>NL4-3</sub> (Adachi et al., 1986) betrifft. Das Produkt ist neu, neben der Methode zu seiner Herstellung sowie seinen neuartigen, vorteilhaften Eigenschaften.

Die neuen sVpr-Proteine betreffen Gesamt- oder Teil-Sequenzen des regulatorischen HIV-Proteins Vpr. Diese Produkte zeichnen sich dadurch aus, daß sie in ihrer Sequenz bisher noch nicht beschrieben wurden, auf neuem Wege hergestellt werden, über einen hohen Reinheitsgrad verfügen, im großen Maßstab und mit ökonomisch vorteilhaften Ausbeuten hergestellt werden können sowie als Endprodukte des Herstellungsverfahrens unter physiologischen Bedingungen löslich sind und keiner Proteinaggregation unterliegen.

Es konnte gezeigt werden, daß derartige sVpr-Proteine antigene, biologische und physikochemische Eigenschaften besitzen, die mit den viralen, in HIV-1-infizierten Zellen exprimiertem Vpr vergleichbar und/oder identisch sind. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß sVpr-Proteine die Virusreplikation von verschiedenen HIV-1-Isolaten in primären humanen Zellen aktiviert und daß dabei vor allem die Aktivität von endogenem viralen Vpr komplementiert werden kann.

Die erfindungsgemäßen sVpr-Proteine besitzen antigene Eigenschaften - ähnlich anderen viralen Vpr -

und können deshalb für die Herstellung von hochreinen und Epitop-spezifischen Antikörpern verwendet werden. Dies zeigt sich durch Immunisierungsstudien mittels sVpr-Proteinen und nachfolgender Charakterisierung der dadurch gewonnenen Antikörper.

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, daß die erfindungsgemäßen sVpr-Proteine eine natürliche Proteinfaltung annehmen, in physiologischen wässrigen Systemen lösbar sind und dadurch für die Aufklärung der atomaren und 3D-Struktur von Vpr mittels spektroskopischer Techniken wie CD (Circulardichroismus) und NMR (nuclear magnetic resonance)-Analysen wie auch mittels RKSA (Röntgenkristallstrukturanalyse)-Untersuchungen zugänglich sind.

Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird am Beispiel des Peptides sVpr1-96 sowie Teilsequenzen davon demonstriert. Das Peptid sVpr1-96 umfaßt die authentische Aminosäuresequenz des nativen Vpr-Proteins, welches durch das *vpr* Gen des molekularen Isolates HIV-1<sub>NL4.3</sub> kodiert wird. Derartige synthetische Vpr-Produkte wurden bisher nicht beschrieben.

Zur Lösung der Aufgabe wird im Rahmen der Erfindung dargestellt, daß sVpr1-96 die Virusreplikation von verschiedenen T-Zell- und Makrophagen-tropen HIV-1 Viren in kultivierten humanen Blutlymphozyten aktivieren kann und dabei insbesondere in humanen Monozyten/Makrophagen den Verlust von viralen Vpr in *vpr*-defizienten HIV-1-Mutanten *in trans* komplementieren kann. Eine solche Aktivität wurde nur für *ex vivo* Vpr demonstriert und auch nur in HIV-1 infizierten permanenten T-Zelllinien oder HIV-1 infizierten Kulturen von primären Lymphozyten. Die aktivierende Wirkung von Vpr wurde bisher noch nicht in isolierten Monozyten/Makrophagen demonstriert. Auch wurde noch nicht über eine aktivierende Wirkung von sVpr-Proteinen generell und spezifisch nicht für sVpr-Proteine des Isolates HIV-1<sub>NL4.3</sub> berichtet. Im Rahmen der Lösung der Aufgabe wird am Beispiel von sVpr1-96 erstmals demonstriert, daß sVpr-Proteine die gleichen oder zumindest ähnliche Eigenschaften wie virales Vpr besitzen, auf jeden Fall biologisch aktiv in kultivierten primären Zellen sind und dadurch für alle anderen in der Erfindungsbeschreibung dargestellten Anwendungsmöglichkeiten von sVpr-Proteinen relevant sind.

Die Aufgabe wird weiterhin durch den Nachweis gelöst, daß sVpr1-96 hervorragende antigene Eigenschaften besitzt und daher als Antigen für eine Immunisierung zum Zweck der Herstellung hochaffiner und spezifischer Antikörper gegen verschiedene Epitope von Vpr geeignet ist. Dadurch sind sVpr1-96 sowie Teilsequenzen davon für die Entwicklung eines Vpr-Antigen (Ag)-ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) geeignet. Das N-terminale Fragment sVpr1-47 sowie das C-terminale Fragment sVpr48-96 dienen dabei als spezifisches Antigen für die Herstellung Epitop-differenter Antikörper, welche im Vpr-Ag-ELISA als Fang- beziehungsweise Nachweis-Antikörper dienen können. Das Gesamt-Peptid, sVpr1-96, dient zur Standardisierung des Vpr-Ag-ELISA. Ein solches serologisches Testsystem kann beispielsweise zur Bestimmung der Konzentration von viralem Vpr im Blut HIV-1 infizierter Individuen eingesetzt werden und besitzt somit potentielle Anwendungsmöglichkeiten als Prognosemarker zur Diagnose der Krankheitsentwicklung und der Infektionsausbreitung *in vivo*, speziell bei der Therapie und der Betreuung von AIDS-Patienten.

Eine weitere Lösung der Aufgabe wird durch die Anwendung von sVpr1-96 und der Teilsequenzen in

der Aufklärung der molekularen Struktur von Vpr erreicht. Derartige Untersuchungen für Gesamt-Vpr-Proteine sind noch nicht beschrieben worden und scheinen mangels verfügbarer Mengen an hochreinen und nativ gefalteten Vpr-Proteinen durch die bisher beschriebenen Verfahren auch kaum möglich zu sein. Ergebnisse dieser Strukturanalysen an sVpr-Proteinen sind neuartige Methoden, welche

(i) einerseits die für NMR und Kristallisation notwendigen hohen Konzentrationen an gefalteten sVpr-Proteinen unter Ausschluß von Peptidaggregation erlauben und andererseits

(ii) durch gezielte Mutationen die Neigung von Vpr zu *cis/trans*-isomeren Konformationen und die dadurch bedingte hohe Flexibilität der N-terminalen Domäne von Vpr unterdrücken. Weiterhin wird durch den Einsatz von Vpr-Bindungspartnern wie zum Beispiel

(i) des HIV-Proteins *p6<sup>Gag</sup>*, welches im Prozeß der Virusassemblierung eine stabile Interaktion mit Vpr eingeht oder

(ii) artifizielle Vpr-Bindungspartner, wie zum Beispiel Fab-Fragmente von anti-Vpr-Antikörpern, welche die Struktur von Vpr in einer "natürlichen" Konformation stabilisieren. Solcherart Stabilisierung wird die Strukturanalyse einzelner Domänen oder von Gesamt-Vpr wesentlich erleichtern und dadurch letztendlich die Aufklärung der hochaufgelösten 3D-Struktur dieses HIV-Proteins ermöglichen.

Bislang wurde beschrieben, daß lösliches extrazelluläres Vpr in einer relativ geringen Konzentration von 0.1 bis 10 nM die Stimulierung der Virusreplikation von T-Zell-tropen und Makrophagen-tropen HIV-1-Viren in Kulturen von primären humanen Lymphozyten sowie CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien erhöht. Weiterhin wurde berichtet, daß Vpr die Zellteilungsrate von mit HIV-1 infizierten als auch von nicht infizierten Zellen beeinflusst. Diese Phänomene wurden für Vpr-Proteine beschrieben, welche entweder durch die Expression von rekombinantem Vpr in Baculovirus-infizierten

Insektenzellen oder durch Anreicherung von viralem Vpr aus peripherem Blut von HIV-1-infizierten Probanden (*ex vivo*) Vpr gewonnenen wurden. Nachteil dieser Studien ist somit, daß die entsprechenden Vpr-Proteine aus unterschiedlichen Proteingemischen wie Blutserum und Zellkulturüberständen extrahiert wurden und daher keine hochgereinigten Produkte zur Anwendung kamen. Aufgrund dieser Umstände kann nicht ausgeschlossen werden, daß die bisher beschriebenen Aktivitäten für Vpr zum Teil oder gänzlich auf Verunreinigungen mit zellulären und/oder viralen Faktoren zurückzuführen sind. Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, daß solcherart gewonnenes Vpr potentiell durch posttranslationale Proteinmodifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung, Sialinisierung, Ubiquitinierung und proteolytische Prozessierung verändert wurde und sich dadurch von Vpr in HIV-infizierten Zellen unterscheidet. Ein weiterer Nachteil ist die mehrfach berichtete Eigenschaft, insbesondere von rekombinanten Vpr exprimiert in *E. coli*, daß Vpr aufgrund seiner starken zytotoxischen Eigenschaften nur als biologisch inertes Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Jedoch selbst als Fusionsprotein zeigte Vpr die Tendenz zur Assoziation mit zellulären Membranen; der Einsatz von ionischen Detergentien zum Zweck der Reinigung von rekombinanten Vpr war dadurch notwendig. Weiterhin wurde berichtet, daß rekombinantes Vpr nach Abspaltung des Fusionsanteiles eine starke Tendenz zur Proteinaggregation zeigte und dadurch nicht in wässrigen Puffern in Lösung gehalten werden konnte.

Es soll weiterhin darauf hingewiesen werden, daß aufgrund seiner Primärsequenz Vpr einen starken Dipol-Charakter aufweist: Die N- und C-Termini haben gegenseitige Netto-Ladung. Zusätzlich werden die polaren Termini durch alpha-Helices mit zum Teil amphipathischem Charakter begrenzt. Außerdem ist anzunehmen, daß der mittlere Teil von Vpr nicht strukturiert ist und dadurch beiden Domänen eine hohe Flexibilität zueinander vermittelt (Figur 1). Diese physikochemischen Eigenschaften sind vermutlich die Ursache für die enorme Tendenz von Vpr, intra- und intermolekulare Wechselwirkungen einzugehen, ein Umstand, welcher wiederum die Reinigung von Vpr aus Proteingemischen erschwert oder gar gänzlich unmöglich macht.

Ein wesentlicher Vorteil für die Analyse der biologischen und strukturellen Eigenschaften von Vpr, insbesondere mit dem Ziel der Charakterisierung von potentiellen Antagonisten der Vpr-Wirkung, bietet daher die chemische Totalsynthese von Vpr. Zur Umgehung von Problemen, welche im Zusammenhang mit bereits publizierten Verfahren zur Gewinnung von *ex vivo* oder rekombinanten Vpr entstanden, werden in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung vollsynthetisch hergestellte Vpr-Proteine (im folgenden als sVpr bezeichnet) für die nachfolgend beschriebenen biologischen Funktionsteste sowie Strukturanalysen eingesetzt.

Erfindungsgemäß wird dazu ein 96 Aminosäure langes sVpr-Protein durch Festphasensynthese hergestellt, hochgereinigt und auf molekulare Integrität überprüft (im weiteren als sVpr1-96 bezeichnet).

Die Proteinsequenz des Produktes sVpr1-96 wurde von der kodierenden Sequenz des *vpr* Gens des molekularen Virusisolates HIV-1<sub>NL4-3</sub> abgeleitet.

Zusätzlich zu sVpr1-96 werden ebenfalls kürzere Fragmente davon in Form von sVpr-Peptiden eingesetzt: Dies betrifft die Peptide sVpr1-47, sVpr48-96, sVpr1-20 und sVpr21-40 sowie die Mutanten sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>) und sVpr21-40(Asn<sup>34</sup>).

Die erfindungsgemäßen Produkte besitzen folgende vorteilhaften Eigenschaften:

Sowohl das Peptid sVpr1-96 als auch seine Fragmente zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Löslichkeit in polaren wässrigen Lösungen aus. Strukturanalysen mittels <sup>1</sup>H NMR- und CD-Spektroskopie deuten auf eine strukturierte Faltung von sVpr1-96 sowie auf eine "geordnete" Oligomerisierung mit der Formierung von di- und/oder trimeren Strukturen des Peptides hin. Protein-Aggregation, wie sie für rekombinantes Vpr mehrfach berichtet wurden, traten für sVpr1-96 und dessen Fragmente selbst in hohen Konzentrationen von mM-Peptidlösung nicht auf.

Weiterhin besteht das Wesen der Erfindung in der Tatsache, daß sVpr1-96 in HIV-1 infizierten Zellen eine biologische Wirkung ausübt, wie sie bisher für andere Vpr-Proteine (*ex vivo* und rekombinantes Protein) bereits beschrieben wurde. Die Wirksamkeit von sVpr-Proteinen und die damit verbundenen vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten werden im folgenden näher erläutert.

#### 1. Testung von sVpr1-96 in Zellkultur und Aufbau von Testsystem für Suche nach Vpr-Antagonisten

Im Rahmen der Erfindung wird nachgewiesen, daß sVpr1-96 in Zellkulturen von primären humanen



18

Lymphozyten, PBMC (peripheric monocuclear blood lymphocytes), ähnlich der bereits beschriebenen Wirkung von nativem Vpr und auch in dem gleichen Konzentrationsbereich von etwa 10 nanoM, die Virusreplikation von T-Zell-tropen und Makrophagen-tropen Viren steigert. Besonders ausgeprägt war die Vpr-vermittelte Steigerung der Virusreplikation in HIV-1 infizierten Makrophagen, den hauptsächlichen Targetzellen für die Vpr-Wirkung *in vivo*. Diese Ergebnisse, zusammengefaßt in den Ausführungsbeispielen 3 und 4, sind ein überzeugender Beweis für die Tatsache, daß die chemische Synthese von sVpr1-96 nicht die biologischen Aktivitäten der erfindungsgemäß hergestellten Vpr-Proteine beeinträchtigt. Es sei darauf hingewiesen, daß dies die erste Beschreibung einer biologischen Funktion von vollsynthetischem Vpr ist. Außerdem wird im Rahmen der Erfindung erstmalig gezeigt, daß isoliertes Vpr in Form von sVpr1-96 die Funktion von endogenem Vpr in *vpr*-defizienten HIV-1-Mutanten in isolierten Monozyten/Makrophagen komplementieren kann (siehe Ausführungsbeispiel 4).

Aufgrund der biologischen Aktivitäten von sVpr1-96 ergeben sich eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten von sVpr-Proteinen. Dies betrifft die Anwendung von sVpr1-96 für die Entwicklung von Testsystemen zur Ermittlung von potentiellen Vpr-inhibierenden Agenzien. Hierzu wird ein Infektionsmodell mit entweder permanenten Monozyten-Zelllinien oder primären Zellen entwickelt. Unmittelbar vor oder nach Infektion solcher *in vitro* Kulturen mit *vpr*-defizienten oder -positiven HIV-Viren werden definierte Mengen an sVpr1-96 zugesetzt, welche zuvor mit potentiellen Vpr-Antagonisten behandelt wurden. Die Unterdrückung der durch sVpr1-96 vermittelten Steigerung der Virusreplikation ist ein direkter Hinweis auf die Wirksamkeit solcher Vpr-Inhibitoren. Die relative einfache und auch ökonomisch vertretbare Verfügbarkeit von im Grunde unbeschränkten Mengen an sVpr1-96, welche im Testsystem selbst in äußerst geringen nanoM-Konzentrationen eingesetzt werden, ermöglicht den Aufbau von umfangreichen Screening-Assays.

## 2. Verwendung von sVpr1-96 für die Herstellung von Vpr-spezifischen Antikörpern und die Entwicklung von Diagnostika

Ein unmittelbarer Einsatz für sVpr1-96 bzw. der davon abgeleiteten synthetischen Fragmente ergibt sich aus deren immunogenen Eigenschaften, entweder zur Erzeugung Vpr-spezifischer mono- und polyklonaler Antikörper oder zum Nachweis von Vpr-Antikörpern im Serum HIV-1-infizierter Probanden. Letzteres kann für den Einsatz in der klinischen Serodiagnostik zur Identifizierung einer HIV-Infektion nur als Ergänzung zu den klassischen HIV-Antikörpernachweisen dienen, da nur ca. 30-50% aller HIV-1-Infizierten Serumantikörper gegen Vpr entwickeln. Im Unterschied dazu sind sVpr-Proteine jedoch von großem Nutzen für die Etablierung eines Zwei-Seiten-Ag-ELISA zur Bestimmung der Konzentration von Vpr im peripheren Blut HIV-1-infizierter Patienten. Es liegen Hinweise in der Literatur vor, wonach die Konzentration an Serum-Vpr mit der des HIV-Hauptantigens p24<sup>Gag</sup> als auch dem Status der Krankheitsprogression korreliert. Ein derartiger Vpr-Ag-ELISA dient daher als sensitiver Prognosemarker, welche andere, weitaus aufwendigere und kostenintensivere Methoden ablöst oder ergänzt. Dies betrifft zum Beispiel die Polymerasekettenreaktion zur Bestimmung der Viruskonzentration im Blut bzw. die "fluorescent activated cell sorting" (FACS)-Analyse zur

Bestimmung der Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Ein Vpr-Ag-ELISA zur Verwendung als Prognosemarker sowie als Marker zur Überwachung der Wirksamkeit einer antiviralen Therapie bedeutet eine enorme Kosten- und Zeiteinsparung.

Für die Herstellung eines solchen Vpr-Ag-ELISA werden zunächst N- und C-terminale Fragmente von sVpr1-96 in Form der Peptide sVpr1-47 und sVpr48-96 für die Immunisierung (zum Beispiel von Kaninchen, Schaf, Maus) mit dem Ziel der Gewinnung von Epitop-spezifischen hochaffinen mono- und oder polyklonalen Antikörpern eingesetzt. Derartige Vpr-spezifische Antikörper werden im Falle von polyklonalen Immunseren durch Reinigung (IgG-Anreicherung und Immunaффinitätsreinigung an entsprechenden immobilisierten Vpr-Peptiden) von unspezifischen Antikörpern befreit. Serum-Vpr aus Blutproben von HIV-1-infizierten Individuen wird als "Fang"-Antikörper an die feste Phase von 96-well Platten immobilisierten Vpr-Antikörpern gebunden. Der Nachweis des gebundenen Vpr-Antigens erfolgt dann mittels eines Nachweis-Antikörpers, welcher an bestimmte Enzyme, zum Beispiel Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Anhand der Intensität der nachfolgenden Enzymreaktion kann die Menge an gebundenem Vpr-Antigen abgeleitet werden. Für die Standardisierung des Vpr-Ag-ELISA wird sVpr1-96 eingesetzt.

Weiterhin können sVpr1-96 und seine Fragmente zur Herstellung und Charakterisierung von Vpr-spezifischen monoklonalen Antikörpern angewendet werden. Hierzu werden Balbc-Mäuse zunächst mit sVpr1-96 immunisiert. Die Herstellung von Vpr-spezifischen Hybridomzelllinien erfolgt nach beschriebenen Standard-Methoden. Die Epitop-Charakterisierung derartiger monoklonaler Antikörper erfolgt mittels überlappender sVpr-Peptidfragmente.

Wesentlich für die Realisierbarkeit der erfindungsgemäßen Anwendung von sVpr-Peptiden mit dem Ziel der Entwicklung von immunologischen Testsystemen ist der Nachweis, daß synthetische Vpr-Peptide in Form von sVpr1-96 dem nativen Vpr ähnliche immunogene Eigenschaften besitzen. Dies wird erfindungsgemäß dadurch bestätigt, daß sVpr1-96 in Kaninchen injiziert und polyklonale anti-Vpr spezifische Seren gewonnen werden. Diese Antiseren haben einen hohen Titer an Vpr-spezifischen Antikörpern und sind geeignet für den Nachweis von Vpr sowohl im Westernblot als auch mittels Immunpräzipitation. Die Nachweisgrenze liegt bei diesen Methoden zwischen 1 und 10 nanoM Vpr. Weiterhin können diese Antikörper für den *in situ* Nachweis von Vpr mittels immunhistologischer Nachweistechiken angewendet werden.

### 3. Einsatz von sVpr1-96 zur Aufklärung der molekularen Struktur von Vpr

Bislang sind keine Informationen zur Strukturaufklärung an kompletten Vpr-Molekülen bekannt geworden. Lediglich einzelne C-terminale Domänen von Vpr in Form von ca. 25 Aminosäure langen synthetischen Peptiden wurden mittels CD- und NMR-spektroskopischer Studien untersucht und Teilstrukturen davon bereits beschrieben. Die Gründe hierfür sind vermutlich einerseits mangelnde Verfügbarkeit von größeren Mengen an reinem Vpr-Protein sowie andererseits die im Rahmen der Erfindung bestätigte Tatsache, daß Prolin-Reste im N-Terminus von Vpr einer *cis/trans*-isomeren

Konformationsänderung unterliegen.

Das Wissen um die Struktur von Vpr ist jedoch wesentliche Voraussetzung zum Verständnis der molekularen Wirkungsmechanismen dieses Regulatorproteins. Diese Informationen sind wiederum die Basis für die gezielte Entwicklung von spezifischen Vpr-Antagonisten, welche wiederum neuartige antivirale und HIV-therapeutische Strategien darstellen.

Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe der Strukturanalyse von sVpr-Peptiden dadurch gelöst, daß größere Mengen an reinem Vpr in Form von sVpr1-96 für Methoden der Strukturaufklärung wie RKSA und spektroskopische Methoden wie CD und NMR eingesetzt werden. Weiterhin werden verschiedene Wege beschrieben, mit welchen die hohe Flexibilität der N-terminalen Domäne von Vpr eingeschränkt oder gänzlich verhindert werden kann. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

(i) Das Peptid sVpr1-96 und seine Fragmente können ohne Proteinaggregation in hohen, millimolaren Konzentrationen in Lösung gehalten werden. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für nachfolgende Strukturanalysen. Es liegen Hinweise auf geordnete Faltung, möglicherweise Oligomer-Bildung vor.

(ii) Weiterhin wurden deutliche Hinweise auf *cis/trans*-Isomeren in einem, mehreren oder allen der vier Pro-Reste in der N-terminalen Domäne von sVpr1-96 ermittelt. Dies ist eine neuartige Erkenntnis, welche die Lösung zur Strukturaufklärung von Vpr vermittelt: Erfindungsgemäß wird zur Lösung dieses Problems folgende Strategie verfolgt:

a) Studie an überlappenden Peptiden, sVpr1-20 und sVpr21-40. Dadurch werden die problematischen Prolinreste mit der Neigung zu *cis/trans*-Isomeren identifiziert.

b) Solcherart identifizierte Prolinreste werden durch konservative Austausche, in der Regel durch Asparagin, ersetzt und in Form der Peptide sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>) sowie sVpr21-40(Asn<sup>35</sup>) analysiert.

Nachfolgend werden diese Mutanten ebenfalls im Kontext von Gesamt-Vpr, als Peptid sVpr1-96, hinsichtlich Struktur und biologischer Funktionen untersucht.

c) Durch den Einsatz von strukturstabilisierenden Lösungsbedingungen (Salz, pH, Detergentien zur Stimulierung eines membranähnlichen Milieus) sowie strukturstabilisierenden Faktoren, wie zum Beispiel natürliche (UBA2-Domäne des DNA-Reparaturproteins HHR23A, p6<sup>Gag</sup>-Domäne des HIV-1 Gag-Polypeptidprecursurs Pr55<sup>Gag</sup>) und artifizielle (Fab-Fragmente von Vpr-spezifischen Antikörpern) Bindungspartner soll die Flexibilität der N-terminalen Domäne unterdrücken und dadurch das Gleichgewicht zu einer geordneten Struktur von sVpr-Proteinen verschieben.

Aufgrund der beschriebenen funktionellen, antigenen und strukturellen Eigenschaften ergeben sich für sVpr-Proteine weitere Anwendungsmöglichkeiten:

4. Einsatz von sVpr-Proteinen in der virologischen Grundlagenforschung von HIV-Infektionen, speziell zur Aufklärung der molekularen Pathomechanismen von Vpr

Dies betrifft Studien zur Wechselwirkung von Vpr mit zellulären Proteinen wie zum Beispiel dem Glucocorticoidrezeptor GR-II oder Studien der Vpr-induzierten Mechanismen von Apoptose, G2-Arrest und Zelldifferenzierung.

## 5. Einsatz von sVpr-Peptiden im Tiermodell

Mit der Verfügbarkeit von größeren Mengen an biologisch aktiven sVpr-Proteinen ist erstmalig die Möglichkeit gegeben, die Wirkung von Vpr beziehungsweise seiner potentiellen Antagonisten in umfangreichen Tiermodell-Studien zu untersuchen. Dies betrifft insbesondere Infektionsstudien an Affen, z.B. Rhesusaffen, welche mit Affen-Immundefizienzviren (SIV) oder HIV-SIV (SHIV) chimären Viren infiziert werden.

## 6. Einsatz von sVpr-Peptiden bei der Entwicklung von Vektoren für Gentransfer in der Gentherapie

Die meisten der bislang applizierten/getesteten Methoden des Gentransfers für gentherapeutische Zwecke basieren auf der Integration eines bestimmten Gens in die Target-Zelle mittels retroviraler Vektoren. Leider können aber nur Lentiviren des HIV-Typen, solche, die also Vpr und andere Komponenten des Präintegrationskomplexes enthalten, auch die sich nicht mehr teilenden Zellen "treffen". Dies betrifft so bedeutende Gewebe wie neuronale Zellen, Monozyten/Makrophagen und andere ausdifferenzierte Zellen, welche bei Anwendung von herkömmlichen Retroviren für Gentransfermethoden auf die Mitose der möglichen Targetzellen angewiesen sind. Eine Alternative hierzu ist die *in vitro* Assemblierung von Komponenten des HIV-Präintegrationskomplexes, bestehend aus dem Matrix-Protein p17<sup>MA</sup>, viraler Integrase, dem viralen Genom sowie Vpr.

## 7. Entwicklung von Vpr-Analoga/Antagonisten auf der Basis von D-Aminosäuren

Die chemische Synthese von sVpr-Proteinen hat, neben den bereits oben erwähnten Vorzügen, den wesentlichen weiteren Vorteil, daß Peptide chemisch so verändert werden können, daß entweder alle oder nur gewünschte biologische Aktivitäten erhalten bleiben. Ziel dabei ist es, den Metabolismus und damit die clearance Rate von sVpr-Proteinen *in vivo* und deren Antagonisten auf Peptidbasis im Interesse einer längeren Halbwertszeit dieser Produkte zu verändern. Derartige Modifizierungen sind ausschließlich nur durch chemische Totalsynthese, nicht jedoch durch rekombinante DNA-Techniken möglich. Eine denkbare Möglichkeit wäre zum Beispiel sicher auch die Entwicklung von stabilen zyklischen Pseudo-Peptiden, welche den Teil von p6<sup>Gag</sup> nachahmen, der mit Vpr in Wechselwirkung tritt. Werden solche Peptide von HIV-infizierten Zellen aufgenommen, würde Vpr nicht mehr in freigesetzte Virionen verpackt und könnte dadurch außerhalb der Zelle nicht mehr wirksam werden. Zum Beispiel würde in einem solchen Falle die Vpr-vermittelte Infektion von Monozyten/Makrophagen ausfallen und dadurch die Ausbreitung der Infektion im Organismus eingeschränkt werden oder völlig ausbleiben.

Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

2i

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1: Synthese und Reinigung von-Vpr-Peptiden

#### Beispiel 1a:

#### 10 Synthese von Vpr-Peptiden - Allgemeine Vorschrift

Die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide erfolgte an einem Serin-Harz der Fa. Rapp Polymere Tübingen an einem ABI 433A Synthesizer (Perkin Elmer).

Alle N-terminalen Peptide wurden an einem Polystyren-polyoxyethylen-Trägerharz (TentaGel R-RAM-Harz der Fa. Rapp Polymere) synthetisiert.

15 Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels FMOC(Fluormethyloxycarbonyl)-Strategie unter Verwendung nachfolgender Schutzgruppen: O-t-Butylester für Glu und Asp, OtBu-Ether für Serin, Tyrosin und Threonin, Boc (tert-Butoxycarbonyl-) für Lysin und Tryptophan, Trt (Trityl - Triphenylmethyl) für Histidin, Glutamin und Asparagin sowie Pbf (2.2.4.6.7-pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-) für Arginin.

20 ~~Nach Beendigung der Synthese~~ erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde. Das Harz wurde abgetrennt, die Reaktionslösung eingeeengt und mit Heptan versetzt. Es wurde erneut eingeeengt und das verbleibende Öl mit Diethylether digeriert. Das rohe Peptid wurde abgesaugt und anschließend aus 10%iger Essigsäure lyophilisiert.

#### Beispiel 1b:

#### Reinigung der Peptide - Allgemeine Vorschrift

Zur Reinigung wurden jeweils 100 mg Rohpeptid an einer präparativen HPLC-Anlage (Shimadzu LC-8 Anlage) chromatographiert. Alle Peptide wurden an einer Kieselgelsäule (300 x 400 mm Vydac-RP18-Säule, Korngröße 15 - 20  $\mu$ ) mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus A = 1% TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und B = 0,1% TFA in 80%igem Acetonitril mit einem Fluss von 100 ml / min gereinigt. Die Eluate wurden eingeeengt und lyophilisiert.

#### Beispiel 1c: sVpr1-96

35 Das Peptid wurde an einem TentaGel S-AC-Harz (0,20 mmol/Gramm) an einem ABI 433 aufgebaut. Am Schluß der Synthese wurde die FMOC-Schutzgruppe abgespalten, das Harz nacheinander mit

Dimethylformamid und Methylenchlorid gewaschen und getrocknet. Das Peptid wurde dann in der eingangs beschriebenen Weise vom Harz abgespalten und anschließend gereinigt.

Molmasse: 11378      gef. 11381

sVpr1-96:

- 5 H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

10

Beispiel 1d: sVpr1-47

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Molmasse: 5728      gef. 5728.8

5 H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-NH<sub>2</sub>

Beispiel 1e: sVpr48-96

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

- 20 Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

Beispiel 1f: sVpr1-20

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr1-20

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>

Beispiel 1g: sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>)

- 30 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

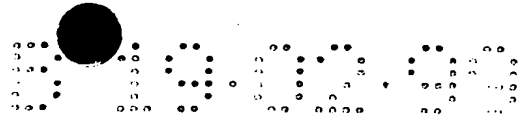
sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>)

H-Met-Glu-Gln-Ala-Asn-Glu-Asp-Gln-Gly-Asn-Gln-Arg-Glu-Asn-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>

Beispiel 1h: sVpr21-40

- 35 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Wildtyp-Sequenz



sVpr21-40

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>

Beispiel 1i: sVpr21-40(Asn35)

5 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr21-40(Asn<sup>35</sup>)

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>

Beispiel 1j: sVpr11-25

10 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr 11-25

Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Glu-Glu

Beispiel 1k: sVpr41-55

15 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr41-55

Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala

Beispiel 1l: sVpr46-60

20 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr46-60

Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile

Beispiel 1m: sVpr56-70

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr56-70

Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile

Beispiel 1n: sVpr66-80

30 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr66-80

Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg

Beispiel 1o: sVpr76-96

35 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

sVpr76-96

Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

### Beispiel 2:

#### Herstellung von polyklonalen anti-Vpr-Antikörpern durch Immunisierung mit sVpr1-96

5 mg sVpr1-96 wurden in H<sub>2</sub>O gelöst, mit Freundschem Adjuvans versetzt und für Standardimmunisierung eines Kaninchen eingesetzt. Die so gewonnenen Immunseren, Bezeichnung als "R-96", wurden gepoolt und portioniert eingefroren.

Für die Testung der Nachweisgrenze von R-96 wurde eine Verdünnungsreihe von 0.1 bis 10 ng sVpr1-96 mit jeweils 200 micro-l humanen Serum eines HIV-1 seronegativen Probanden sowie 1 micro-L PBS versetzt und anschließend der Immunpräzipitation mit R-96 unterzogen. Dazu wurden für je eine Reaktion jeweils 5 micro-L R-96 an 30 micro-L Protein-G Sepharose beads (GammaBind-G-Sepharose beads, Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ, USA) absorbiert. Die Lysate wurde zuvor mit Protein-G Sepharose beads beladen mit IgG von Kaninchen Pre-Immunserum pre-cleared. Die Präzipitation wurde nach bereits beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt (Schubert und Strebel, 1994).

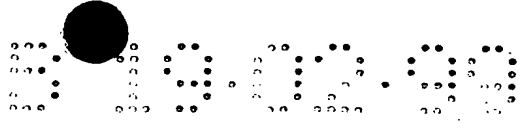
Die Immunpräzipitate wurden in SDS-Probenpuffer (2% SDS, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1% Glycerol, 65 mM Tris-hydrochloride (pH 6.8) denaturiert (10 min, 95 °C) und in einem 12,5% denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE, 12.5% Acryl aide gels, FMC Bioproducts, Rockland, ME) aufgetrennt (Fig. 2B). In dem gleichen Gel wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe von sVpr1-96 (0.01 bis 10 nanoM) aufgetrennt (Fig. 2A). Die aufgetrennten Proben wurden auf Immobilon polyvenylidene difluoride (PVDF)-Membranen (Millipore Corp., Bredford, MA) elektrotransferiert, mit 5% BSA in PBS (0,3% Tween 20) geblockt und anschließend mit einer 1:1000 Verdünnung von R-96 in 3% BSA inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mittels <sup>125</sup>I-Protein G (0.1 mCi/ml; New England Nuclear, DuPont, Wilmington, DE) und nachfolgender Autoradiographie detektiert (Fig. 2). Die Ergebnisse der Westernblot-Studie zeigen, daß mit R-96 selbst 0.01 ng sVpr1-96 zweifelsfrei nachgewiesen werden können. Die Nachweisgrenze von sVpr1-96 mittels Immunpräzipitation liegt im Bereich von 1 bis 10 nanoM sVpr1-96. In anderen Untersuchungen (Daten nicht demonstriert) konnte gezeigt werden, daß R-96 ebenfalls mit viralen Vpr, exprimiert in HIV-1-infizierten Zellen, im Westernblot als auch in der Immunpräzipitation gleicherweise reagiert.

### Beispiel 3:

#### sVpr1-96 erhöht Virusreplikation und Zahl lebender Zellen in Kulturen von humanen peripheren Blutlymphozyten (PBMC)

Für Infektionsexperimente wurden entsprechend bereits publizierter Methoden (Schubert et al., 1995) parallele Kulturen von PBMC, welche aus peripheren Blut HIV-1-seronegativer gesunder Probanden isoliert wurden, für zwei Tage durch Inkubation mit Phytohämagglutinin (PHA) und Interleukin 2 (IL-2)





26

stimuliert. Die so aktivierte Lymphozytenkultur wurde mit gleichen infektiösen Dosen von gereinigtem Virusstock des T-Zell-tropen Isolates HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert. Je eine Hälfte der infizierten Kultur wurde mit 10 nM sVpr1-96 behandelt, die andere mit 10 nM Lösung eines löslichen Kontrollpeptides, Vpu32-81, welches keine biologischen Aktivitäten in PBMC ausübt und unter den gleichen Bedingungen wie sVpr1-96 hergestellt und gereinigt wurde (Henklein et al., 1993). Das Kontrollpeptid Vpu32-81 umfaßt die 50 Aminosäure lange zytoplasmatische Domäne des HIV-1 spezifischen Virusproteins U (Vpu) (Wray et al., 1996). Die Inkubation mit den Peptiden wurde im gesamten Verlauf des Experimentes aufrecht erhalten, ca. 80% des Zellkulturmediums wurde alle zwei Tage erneuert und mit frischen Peptidlösungen versehen. Zur Bestimmung der Menge an freigesetzten Viruspartikeln wurden Proben der Zellkulturüberstände bei -80°C eingefroren. Am Ende der Infektionsstudie wurde in parallelen Reaktionen die Aktivität von Virus-assoziiierter Reverser Transkriptase (RT) bestimmt und im Histogramm (Figur 3A) gegen die Zeit aufgetragen. Anhand der RT-Profile, dargestellt in Figur 3A, ist deutlich zu erkennen, daß in Gegenwart von sVpr1-96 die Virusreplikation etwa um den Faktor 2 im gesamten Verlauf der Infektionsausbreitung erhöht war. Diese durch sVpr1-96 stimulierte Aktivierung der Virusproduktion erreicht das Maximum zwei Tage nach dem zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (Tag 7 post Infektion) und hält danach mit konstantem Faktor an. Studien zur Dosis-Abhängigkeit (Daten nicht gezeigt) ergaben, daß dieser Effekt maximal bei einer Konzentration von etwa 10 nM sVpr1-96 auftritt.

Parallel zur Bestimmung der RT-Aktivitäten wurde während des Infektionsexperimentes die Zahl der lebenden Zellen durch Tryphanblau-Ausschluß zu jedem Zeitpunkt des Mediumwechsel ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen (Figur 3B). ~~Daran ist deutlich zu erkennen, daß im Vergleich zur Kontrollkultur die Zahl der überlebenden Zellen während der Infektionsausbreitung in der mit sVpr1-96 behandelten Kultur etwa um den Faktor 1.5 erhöht ist. Generell ist eine Infektionsausbreitung in einer HIV-infizierten Zellkultur dadurch gekennzeichnet, und so auch in der Kontrollkultur zu erkennen (Figur 3B), daß mit Erreichen der maximalen Virusproduktion der zytopathische Effekt des Virus zum Tragen kommt und dadurch die Zahl der überlebenden Zellen rapid abnimmt. Das ist in Gegenwart von sVpr1-96 nicht der Fall, die Zellzahl nimmt erst ab Tag 9 post Infektion und mit geringerer Kinetik als in der Kontrollkultur ab. Anhand dieses Experimentes kann jedoch noch nicht ermittelt werden, ob dieser Effekt auf Unterbindung der zytopathischen Mechanismen wie zum Beispiel der HIV-1-induzierten Apoptose und/oder der Zellfusion/Synzytiabildung zurückzuführen ist, oder ob sVpr1-96 lediglich die Zellzahl nicht infizierter Zellen in der Kultur erhöht. Auffallend ist jedoch, daß dieser Effekt nicht allein auf die Replikation von Wildtyp-Virus beschränkt war und auch mit vergleichbarer Intensität in PBMC-Isolaten von verschiedenen Donoren auftrat. Hierzu wurden PHA-II2-stimulierte PBMCs von einem anderen Donor mit den T-Zell-tropen Wildtyp- Virus HIV-1<sub>NL4-3</sub> (Figur 3C) oder mit den chimären Makrophagen-tropen Virus NL4-3(AD8) (Figur 3D) infiziert und mit 10 nM sVpr1-96 oder dem Kontrollpeptid Vpu32-81 inkubiert. Ebenfalls wurden unter den gleichen Bedingungen PBMCs mit dem vpu-defizienten Virus NL(AD8)-U<sub>DEL1</sub> (Figur 3E) sowie mit dem vpr-defizienten Virus NL(AD8)deltaR (Figur 3F) infiziert. Es ist bekannt, daß sowohl Vpu als auch Vpr die Virusreplikation~~

in PBMC stimulieren kann. In beiden Fällen wurde ähnlich der Situation bei Wildtyp-Virus HIV-1<sub>NL4-3</sub> eine 3- bis 5-fache Steigerung der Virusreplikation in Gegenwart von 10 nM sVpr1-96 beobachtet. 21

Zusammengefaßt kann daher festgestellt werden, daß in primären humanen T-Lymphozyten sVpr1-96 die Virusreplikation aktiviert und gleichzeitig die Rate an überlebenden Zellen innerhalb der infizierten Kultur erhöht ist. Dieser Effekt erfolgt unabhängig von der endogenen Expression der akzessorischen HIV-Proteine Vpu und Vpr.

#### Beispiel 4:

#### sVpr1-96 komplementiert die Replikation von vpr-defizienten HIV-1-Mutanten in Kulturen von primären humanen Monozyten/Makrophagen

Um die Wirkung von sVpr1-96 auf die Virusreplikation in primären humanen Monozyten/Makrophagen zu testen, wurden "monocyte derived macrophages" (MDM)-Zellen aus Blutlymphozyten von drei verschiedenen HIV-seronegativen gesunden Individuen (Donoren #1 bis 3) gewonnen und zum Zweck der Ausdifferenzierung für 14 Tage kultiviert. Parallele Kulturen von den jeweiligen MDM-Isolaten wurden mit gleichen infektiösen Dosen des chimären Makrophagen-tropen Virus NL(AD8) sowie dessen vpr-defizienten Mutante Virus NL(AD8)deltaR infiziert. Mit Beginn der Infektion wurden parallele Kulturen mit 10 nM sVpr1-96 sowie als Kontrolle mit 10 nM Vpu32-81 inkubiert. Alle drei Tage wurden 90% des Kulturmediums erneuert und neue Peptidlösungen zu den betreffenden Kulturen gegeben. Aliquote der Kulturüberstände wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten gesammelt und bei -80°C eingefroren. Abschließend wurde die Menge an Virus-assoziiert RT-Aktivität ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Die resultierenden Replikationsprofile sind in Figur 4 dargestellt. Während eine produktive Infektionsausbreitung in der MDM-Kultur für Wildtyp-Virus NL4-3(AD8)-mit maximaler Virusproduktion etwa am Tag 24 post Infektion auftrat (Figur 4A), war die Replikation sowie die Infektionsausbreitung der vpr-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR wesentlich reduziert: In den MDM-Kulturen der Donoren #1 und #2 (Figur 4B,C) betrug diese nur etwa 15% des Wildtyp-Virus, in der MDM-Kultur des Donors #3 konnte sogar keine produktive Infektion mit NL(AD8)deltaR festgestellt werden (Figur 4D). Die eingeschränkte Replikation der vpr-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR ist in Übereinstimmung mit der bereits beschriebenen akzessorischen Funktion von Vpr in Makrophagen/Monozyten.

Die kontinuierliche Zugabe von 10 nM exogenem sVpr1-96 im gesamten Verlauf der Infektionsstudie bewirkte keinen positiven Effekt auf die Virusreplikation von Wildtyp-Virus NL4-3(AD8) das Replikationsprofil wurde sogar auf ~ 60% reduziert (Figur 4A). Im Unterschied dazu, hatte sVpr1-96 einen deutlich stimulierenden Effekt auf die Replikation der vpr-defizienten Mutante NL(AD8)-deltaR: Die Virusproduktion in MDM-Kulturen von drei verschiedenen Donoren wurde durch sVpr1-96 auf das Mehrfache gesteigert und war fast identisch mit dem Replikationsprofil von Wildtyp-Virus in Gegenwart von sVpr1-96 (Figur 4C, D). Selbst in der MDM-Kultur, in der keine Infektionsausbreitung der vpr-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR beobachtet wurde, konnte sVpr1-96 die Virusreplikation

vollständig reaktivieren (Figur 4D).

Zusammengefaßt kann somit festgestellt werden, daß (i) in kultivierten humanen Monozyten/Makrophagen sVpr1-96 keinen positiven Einfluß auf die Replikation von Wildtyp-Virus (mit bereits vorliegender endogener Synthese von viralen Vpr) ausübt, jedoch (ii) exogenes sVpr1-96 die akzessorische Wirkung von endogenen Vpr in *vpr*-defizienten Virusmutanten komplementieren kann und dadurch die Replikationskompetenz von *vpr*-defizienten Viren auf dem Niveau von Wildtyp-Virus restauriert.

#### Beispiel 5:

#### <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie an sVpr1-96

Die ersten NMR-Spektren wurden in 2mM Lösung (17mg/mL) von sVpr1-96 in 50% (v/v) TFE aufgenommen. Das 1D-Spektrum (als Abszisse und Ordinate in Figur 5) zeigt relativ breite Banden für dieses kleine Protein. Dies weist darauf hin, daß unter den gewählten Lösungsbedingungen das gesamte Peptid oder ein Teil davon zu Assoziationen neigt. Das Peptid wurde in wässriger Lösung, ohne Salz und Puffer, gelöst. Die Zugabe von DTT bewirkte keine Veränderungen im Spektrum, was eine Disulfid-Bindung ausschließt. Die NMR-Daten lassen keine Hinweise auf hocholigomere Proteinaggregate erkennen wie diese für rekombinantes Vpr mit Molekulargewichten von über 100 kDa definiert wurde (Zhao et al., 1994). Sollte eine solche hochmolekulare Form von sVpr1-96 (vermutlich Hexamer) tatsächlich vorliegen, dann würde sich ein solches Molekül sehr langsam bewegen und daher zu breiten Signalen tendieren. Ein solches Phänomen war in den Spektren von sVpr1-96 nicht erkennbar. Einzelne Spin-Systeme (z.B. 3 x Alanin, 1 x Valin) konnten eindeutig zugeordnet werden.

Da sich diese Spinsysteme über das gesamte Molekül erstrecken, ist dies ein Argument gegen das Vorliegen von hexameren Strukturen. Die bisherigen Daten lassen eher vermuten, daß sVpr1-96 in wässriger Lösung hauptsächlich als Gleichgewicht zwischen mono- und dimeren Strukturen vorliegt, welche zu den teilweise breiten Signalen beitragen kann.

Um das Problem weiter zu klären, wurden 2D TOCSY und NOESY Spektren von sVpr1-96 aufgenommen, welche Hinweise auf *cis/trans* isomere Formen erbrachten: Bestimmte Bereiche von sVpr1-96 zeigten besonders breite Signale, während andere deutlich scharfe cross peaks in den 2D-Spektren zeigen. Im niedrigeren Bereich des TOCSY Spektrums (10-9.3 ppm) sind drei Signale von drei Tryptophan-Seitenketten zu erkennen (Figur 5A). Weitere Ausdehnung dieser cross peaks läßt Rückschlüsse auf Heterogenität zu, das Hauptsignal zeigt mindestens zwei kleinere Signale. Gleiche Beobachtung traten bei Histidin (Figur 6B) und Arginin (Figur 6C) auf. Da diese drei Typen von Aminosäureketten über die gesamte Länge von sVpr1-96 verteilt auftreten (Tryptophan in den Positionen 18, 38 und 54; Histidin in den Positionen 33, 40, 45, 71 und 78 sowie Arginin in den Positionen 12, 32, 36, 62, 73, 77, 80, 87, 88 und 90) und diese cross peaks als solch scharfe Signale auftreten, kann davon ausgegangen werden, daß ein anderes Phänomen als die bislang angenommenen Oligomerisierung von Vpr (Zhao et al., 1994) für die relativ breiten Linien im 1D-Spektrum

verantwortlich sind. Die in Figur 6 dargestellten einzelnen Bereiche deuten auf etwa 20% Heterogenität der untersuchten Signale hin, welche typisch für *cis/trans* Isomeren sind und vermutlich durch die vier Prolin-Reste in sVpr1-96 ausgelöst werden. Solche isomeren Formen sollten einen relativ hohen *cis*-Anteil (bis 40%) für Prolin-Reste in den Positionen 14 und 35 haben, da sich diese in Nähe von aromatischen Aminosäureresten befinden.

Um die Existenz solcher, erstmals zu definierenden *cis/trans* Isomeren in sVpr1-96 weiter zu untersuchen, werden erfindungsgemäß folgende kurze Peptide analysiert:

sVpr1-20 (1-MEQAPEDQGP<sup>10</sup> QREPYNEWTL-20) und

sVpr21-40 (21-ELLEELKSEA<sup>30</sup> VRHFPRIWLH-40)

In folgenden 1D und 2D NMR-Spektren traten multiple Signale für verschiedene Prolin-Reste auf, welche bei beiden Peptiden, sVpr1-20 und sVpr21-40, vertreten sind. Für sVpr21-40 werden etwa 10% *cis*-Protein Konformation ermittelt. Ähnlich wurden für sVpr1-20 Signale für drei *cis*-Proline-Strukturen festgestellt, welche zusammen etwa 30% der Gesamtintensität einnehmen. Zusammengefaßt wird somit festgestellt, daß *cis/trans*-isomere Formen von Prolin die Ursache für heterogene Konformationen in sVpr1-96 sind. Es kann anhand der NMR Berechnungen an den kurzen Peptiden vorausgesagt werden, daß das gesamte Molekül, sVpr1-96 etwa 40% einzelne *cis*, 6% Doppel-*cis* und 0,4% Dreifach-*cis* Konformation aller Prolin-Reste enthält, nur 59% sollte in der *trans*-Struktur vorliegen.

In einen weiteren Schritt der Analyse werden die Prolin-Reste identifiziert, welche hauptsächlich zu dieser Heterogenität beitragen. Diese Prolin-Reste werden dann durch Asparagin in sVpr1-96 in Form eines konservative Austausch ersetzt. Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, Prolin durch eine ähnliche Seitenkettenposition zu ersetzen, welche zwar vergleichbare Einflüsse auf die Faltung des Proteinbackbones hat, jedoch keiner *cis/trans*-Isomerie wie Prolin unterliegt. Der gewählte Austausch von Prolin mit Asparagin basiert auf bereits publizierten Studien zur Korrelationsmatrix von Aminosäureseitenketten und Proteinfaltung (Livingston und Barton, 1996). Solcherart Vpr-Mutanten, welche dann keiner *cis/trans*-Isomerie mehr unterliegen, werden für Strukturaufklärung mittels NMR als auch zur Kristallisation eingesetzt. Die biologischen Aktivitäten solcher Prolin-Asparagin-Mutanten wird nachträglich bestimmt.

#### Beispiel 6: Material und Methoden

##### Beispiel 6a: Molekulare HIV-1-Klone und Plasmid-Konstruktion:

Zur Herstellung von T-Zell-tropen Viren des molekularen Klons NL4-3 wurde das bereits publizierte Plasmid pNL4-3 (Adachi et al., 1986) verwendet und für die Herstellung von Makrophagen-tropen Viren das bereits publizierte Plasmid pNL4-3(AD8) (Schubert et al., 95; Freed et al., 1995; Freed und Martin, 1994). Dieses Plasmid kodiert den molekularen Klon eines chimären Makrophagen-tropen

Virus, in welchem das *env* Gen des primären Makrophagen-tropen Virus AD8 (Theodore et al., 1995) mit dem des T-Zell-tropen Klones NL4-3 ausgetauscht wurde (Freed und Martin, 1994). Für die Replikationskompetenz von HIV-1 in Monozyten/Makrophagen ist ein Abschnitt des *env* Gens, einschließlich des V3- Loops, notwendig (Schubert et al., 95; Freed et al., 1995; Freed und Martin, 1994; O'Brien et al., 1990; Shioda et al., 1991). Zur Herstellung der *vpr*-defizienten Mutante pNL(AD8)-DR wurde das Plasmid pNL4-3(AD8) mit dem Enzym *EcoRI* linearisiert (Basenpaarposition 5743), die überhängenden Enden wurden mit DNA-Polymerase I aufgefüllt und anschließend religiert. Dadurch ergibt sich eine Frameshift-Mutation im *vpr*-Leserahmen, resultierend in der Expression eines N-terminalen Fragmentes von Vpr, welches keine der bislang beschriebenen biologischen Aktivitäten von Vpr ausüben kann.

#### Beispiel 6b: Zellkultur

Hela Zellen wurden in Dulbeccos' modifizierten Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert. PBMCs ("peripheral blood mononuclear cells") wurden durch Gradientenisolation von Blut-Lymphozyten gesunder HIV-1-seronegativer Individuen gewonnen, portioniert und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung eingefroren. Zwei Tage vor Infektion wurden PBMC-Kulturen durch Inkubation mit Phytohämagglutinin (PHA, 1mg/ml) und humanem Interleukin-2 (hIL-2, 20 U/ml) stimuliert, die Behandlung mit hIL-2 wurde anschließend für den gesamten Zeitraum der Kultivierung weitergeführt.

MDM ("monocyte-derived macrophages") wurden durch Elutration entsprechend bereits publizierter Methoden gewonnen (Schubert et al., 1995; Ehrenreich et al., 1993). Adhärenz-Kulturen von MDM wurden zunächst präkultiviert in DMEM supplementiert mit Glucose (4.5 g/L), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 mg/ml) und L-Glutamin (2mM), Natrium Pyruvat (1mM) und 10% humanes Serum nach einer modifizierten Methode von Lazdins et al. (1990). Nach einer 2-wöchigen Differenzierungsphase wurden MDM resuspendiert, geerntet, in einer Konzentration von  $0.5 \times 10^6$  Zellen/ml replatiert und weitere zwei Tage vor Infektion inkubiert.

Als Kontrolle für potentielle Kontaminationen der MDM-Kulturen mit CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, wurde jeweils eine parallele Kultur der präparierten MDM-Isolate ebenfalls mit dem T-Zell-tropen Virus NL4-3 inkubiert. Eine Infektion und Replikation des T-Zell-tropen Virus konnte in keinen der verwendeten MDM-Kulturen festgestellt werden, eine Tatsache, welche die Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in allen MDM-Präparationen attestiert.

#### Beispiel 7: Transfektion und Gewinnung von Virusstocks

Für die Herstellung von Virus-Präparaten wurde Plasmid-DNA von molekularer HIV-1-DNA unter Anwendung der Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode in HeLa-Zellen transfiziert. Dazu wurden konfluente Kulturen von Hela-Zellen ( $5 \times 10^6$  Zellen) mit 25-microg Plasmid DNA in Kalziumphosphat-Kristallen, hergestellt nach einer Methode von Graham und van der Eb (1973), inkubiert und

anschließend einem Glycerol-Schock nach Gorman et al. (1982) unterzogen. Für die Gewinnung von konzentrierten Viruspräparaten wurden zwei Tage nach Transfektion die Zellkulturüberstände geerntet. Anschließend wurden die Zellen sowie deren Bestandteile durch Zentrifugation (1,000 x g, 5 min, 4°C) und Filtration (0.45 microm Porengröße) abgetrennt. Viruspartikel wurden durch Ultra-Zentrifugation (Beckman SW55 Rotor, 1.5 hr, 35,000 rpm, 10°C) pelletiert und nachfolgend in 1 ml of DMEM Medium resuspendiert. Die Viruspräparate wurden durch Filtration sterilisiert (0.45 microm Porengröße) und portioniert eingefroren (-80°C). Einzelne Viruspräparate wurden durch Bestimmung der RT(Reverse Transkriptase)-Aktivität, und zwar anhand eines bereits beschriebenen Tests (Willey et al, 1988), unter Verwendung von [<sup>32</sup>P]-TTP Einbau in ein oligo(dT)-poly(A) Template standardisiert.

#### Beispiel 8: <sup>1</sup>H NMR an sVpr

1D and 2D <sup>1</sup>H NMR Spektren wurden an einem DMX 600 Bruker NMR-Spektrometer ohne spinning bei 300°K aufgenommen. Die Spektren wurden geeicht an dem Restproton des Lösungsmittels Trifluorethanol bei 3.95 ppm. Weitere Details werden in der Legende zu den Figuren gegeben.

#### Literaturverzeichnis

- Adachi, A.; Gendelman, H.E.; Koenig, S.; Folks, T.; Willey, R.L.; Rabson, A.; Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. J. Virol. 59:284-291.
- Arunagiri, C.; Macreadie, I.; Hewish, D.; Azad, A. (1997) A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4+ lymphocytes. Apoptosis 2:69-76.
- Ayyavoo, V.; Mahboubi, A.; Mahalingam, S.; Ramalingam, R.; Kudchodkar, S.; Williams, W.V.; Green, D.R.; Weiner, D.B. (1997) HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor  $\kappa$ B. Nature Medicine 3:1117-1123.
- Balotta, C.; Lusso, P.; Crowley, R.; Gallo, R.C.; Franchini, G. (1993) Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides targeted to the *vpr* gene inhibit human immunodeficiency type 1 replication in primary human macrophages. J. Virol. 67:4409-4414.
- Balliet, J.W.; Kolson, D.L.; Eiger, G.; Kim, F.M.; McGann, K.A.; Srinivasan, A.; Collman, R. (1994) Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes *vpr*, *vpu*, and *nef*: Mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. Virol. 200:623-631.
- Bukrinsky, M.L.; Haggerty, S.; Dempsey, M.P.; Sharova, N.; Adzhubei, A.; Spitz, L.; Lewis, P.; Goldfarb, D.; Emerman, M.; Stevenson, M. (1993) A nuclear targeting signal within HIV-1 matrix protein that over infection of non-dividing cells. Nature (London) 365:666-669.
- Byron K.A.; Varigos, G.; Wooton, A. (1992) Hydrocortisone inhibition of human interleukin-4. Immunology 77:624-626.

36  
Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamret, S.; Rey, M.A.; Santos-Ferreira, M.Q.; Laurent, A.G.; Dauguet, C.; Katlama, C.; Rouzioux, C. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West african patients with AIDS. Science 233:343-346.

Cohen, E.A.; Terwilliger, E.F.; Sodroski, J.G.; Haseltine, W.A. (1988) Identification of a protein encoded by the *vpu* gene of HIV-1. Nature 334:532-534.

Cohen, E.A.; Dehni, G.; Sodroski, J.G.; Haseltine, W.A. (1990a) Human immunodeficiency *vpr* product is a virion-associated regulatory protein. J. Virol. 64: 3097-3099.

Cohen, E.A.; Terwilliger, E.F.; Jalinoos, Y.; Proulx, J.; Sodroski, J.G.; Haseltine, W.A. (1990b) Identification of HIV-1 *vpr* product and function. J. Acquired Immune Defic. Syndr. 3:11-18.

Collman, J.W.; Balliet, J.W.; Greory, S.A.; Friedman, H.; Kolson, D.L.; Nathanson, N.; Srinivasan, A. (1992) An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 66:5717-5721.

Connor, R.I.; Chen, B.K.; Choe, S.; Landau, N.R. (1995) Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. Virology 206: 935-944.

Dayton, A.; Sodroski, J.G.; Rosen, C.A.; Goh, W.C.; Haseltine W.A. (1986) The trans-activator gene of the human T-cell lymphotropic virus type III is required for replication. Cell 44:941-947.

Dedera, D.; Hu, W.; Vander Heyden, N.; Ratner, L. (1989) Viral protein R of human immunodeficiency virus types 1 and 2 is dispensible for replication and cytopathogenicity in lymphoid cells. J.Virol. 63:3205-3208.

Di Marzio, P.;Choe, S.; Ebright, M.; Knoblauch, R.; Landau, N.R. (1995) Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J. Virol. 69:7909-7916.

Dieckmann, T.; Withers-Ward, E.S.; Jrosinski, M.A.; Liu, C-F.; Chen, I.S.Y; Feigon, J. (1998) Structure of human DNA repair protein UBA domain that interacts with HIV-1 Vpr. Nature Struct. Biol. 5:1042-1047.

Doolittle, R.F.; Feng, D.F.; Johnson, M.S.; McClure, M.A. (1989) Origin and evolutionary relationships of retroviruses. Q. Rev. Biol. 64:1-30.

Doolittle, R.F.; Feng, D.F.; McClure, M.A.; Johnson, M.S. (1990) Retrovirus phylogeny and evolution. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 157:1-18.

Ehrenreich, H.; Rieckmann, P. ;Sinowatz, F.; Weih, K.A.; Arthur, L.O.; Goebel, F.-D.; Burd, P.R.; Coligan, J.E.; Clouse, K.A. (1993) Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. J. Immunol. 10:4601-4609.

Emerman, M. (1996) HIV-1, Vpr and the cell cycle. Curr. Biol. 6:1096-1103.

Fletcher, T.M. 3rd.; Brichacek, B.; Sharova, N.; Newman, M.A.; Stivahtis, G.; Sharp, P.M.; Emerman, M.; Hahn, B.H.; Stevenson, M. (1996) Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIVsm. EMBO J. 15:6155-6165.

Fisher, A.G.; Feinberg, M.B.; Josephs, S.F.; Harper, M.E.; Marselle, L.M.; Reyes, G.; Gonda, M.A.; Aldovini, A.; Debouk, C.; Gallo, R.C.; Wong-Staal, F. (1986) The trans-activator gene of HTLV-III is

essential for virus replication. *Nature* 320:367-371.

Freed, E. O.; Martin, M.A. (1994) HIV-1 infection of non-dividing cells. *Nature* (London) 369:107-108.

Freed, E.O.; Englund, G.; Martin, M.A. (1995) Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* 69:3949-3959.

Gallay, P.; Stitt, V.; Mundy, C.; Oettinger, M.; Trono, D. (1996) Role of the karyopherine pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* 70:1027-1-32.

Garrett, E.; Tiley, L.S.; Cullen, B.R. (1991) Rev activates expression of human immunodeficiency virus type 1 *vif* and *vpr* gene products. *J. Virol.* 65:1653-1657.

Gibbs, J.S.; Lackner, A.A.; Lang, S.M.; Simon, M.A.; Sehgal, P.K.; Daniel, M.D.; Desrosiers, R.C. (1995) Progression to AIDS in the absence of a gene for *vpr* or *vpx*. *J. Virol.* 69:2378-2383.

Gillis, S. (1979) Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect of the mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 123:1624-1631.

Gonzalo, J.A.; Gonzale-Garcia, A.; Martinez, C.; Kroemer, G. (1993) Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 177:1239-1246.

Göttlinger, H.G.; Dorfman, T.; Sodroski, J.G. Haseltine, W.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3195-3199.

Graham, F. L.; van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.

Hattori, N.; Michaels, F.; Fargnoli, K.; Marcon, L.; Gallo, R.C.; Franchini, G. (1990) The human immunodeficiency virus type 2 *vpr* gene is essential for productive infection of human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8080-8084.

He, J.; Choe, S.; Walker, R.; Di Marzio, P.; Morgan, D.O.; Landau, N.R. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34<sup>cdc2</sup> activity. *J. Virol.* 69:6705-6711.

Heinzinger, N.K.; Bukrinsky, M.I.; Haggerty, S.A.; Ragland, A.M.; Kewalramani, V.; Lee, M.-A.; Gendelman, H.E.; Ratner, L.; Stevenson, M.; Emerman, M. (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:7311-7315.

Henderson, L.E.; Sowder, R.C.; Copeland, T.D.; Benveniste, R.E.; Oroszlan, S. (1988) Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science* 241:199-201.

Karni, O.; Friedler, A.; Zakai, N.; Gilon, C.; Loyter, A. (1998) A peptide derived from the N-terminal region of HIV-1 Vpr promotes nuclear import in permeabilized cells: elucidation of the NLS region of the Vpr. *FEBS Letters* 429:421-425.

Kino, T.; Gragerov, A.; Kopp, J.B.; Stauber, R.H.; Pavlakis, G.N.; Chrousos, G.P. (1999) The HIV-1 virion-associated protein Vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor. *J. Exp. Med.* 1:51-61.

Kondo, E.; Göttlinger, H.G. (1996) A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6<sup>gag</sup>



required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J.Virol. 70(1):159-164.

Kondo, E.; Mammano, F.; Cohen, E.A.; Göttinger, H.G. (1995) The p6<sup>gag</sup> domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for incorporation of Vpr into heterologous viral particles. J.Virol. 69:2759-2764.

Lang, S.M.; Weeger, M.; Stahl-Hennig, C.; Coulibaly, C.; Hunsmann, G.; Müller, J.; Müller-Hermelink, H.; Fuchs, D.; Wachter, H.; Daniel, M.M.; Desrosiers, R.C.; Fleckenstein, B. (1993) Importance of *vpr* for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. J.Virol. 67:902-912.

Lavallée, C.; Yao, X.J.; Ladha, A.; Göttinger, H.; Haseltine, W.A.; Cohen, E.A. (1994) Requirement of the Pr55<sup>gag</sup> precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. J. Virol. 68:1926-1934.

Lazdins, J. K., K. Woods-Cook, M. Walker, and E. Alteri. 1990. The lipophilic muramyl peptide MTP-PE is a potent inhibitor of HIV replication in macrophages. AIDS Res. Hum. Retroviruses 6:1203.

Levy, D.N.; Fernandes, L.S.; Williams, W.V.; Weiner, D.B. (1993) Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus *vpr*. Cell 72:541-550.

Levy, D.N.; Refaeli, Y.; MacGregor, R.R.; Weiner, D.B. (1994) Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 91:10873-10877.

Levy, D.N.; Refaeli, Y.; Weiner, D.B. (1995) Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. J.Virol. 69:1243-1252.

Livingstone, C.D.; Barton, G.J. (1996) Identification of functional residues and secondary structure from protein multiple sequence alignment. Methods in Enzymology 266:497-512.

Lu, Y.-L.; Bennett, R.P.; Wills, J.W.; Gorelick, R.; Ratner, L. (1995) A leucine triplet repeat sequence (LXX)<sub>4</sub> in p6<sup>gag</sup> is important for Vpr incorporation into Human Immunodeficiency Virus type 1 particles. J. Virol. 69:6873-6879.

Lu, Y.-L.; Spearman, P.; Ratner, L. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. J.Virol. 67:6542-6550.

Luo, Z.; Butcher, D.J.; Murali, R.; Srinivasan, A.; Huang, Z. (1998) Structural studies of synthetic peptide fragments derived from the HIV-1 Vpr protein. Biochem. Biophys. Research Communications 244: 732-736.

Macreadie, I.G.; Arunagiri, C.K.; Hewish, D.R.; White, J.F.; Azad, A.A. (1996) Extracellular addition of a domain of HIV-1 Vpr containing the amino acid sequence motif H(S/F)RIG causes cell membrane permeabilization and death. Mol. Microbiol. 19:1185-1192.

Macreadie, I.G.; Kirkpatrick, A.; Strike, P.M.; Azad, A.A. (1997) Cytocidal activities of HIV-1 Vpr and SAC1P peptides bioassayed in yeast. Protein and Peptide Letters 4:181-186.

Macreadie, I.G.; Castelli, L.A.; Hewish, D.R.; Kirkpatrick, A.; Ward, A.C.; Azad, A.A. (1995) A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 92:27770-27774.

- 35
- Mahalingam, S.; Ayyavoo, V.; Patel, M.; Kieber-Emmons, T.; Weiner, D.B. (1997) Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 71:6339-6347.
- Mahalingam, S.; Collman, R.G.; Patel, M.; Monken, C.E.; Srinivasan, A. (1995a) Funktional analysis of HIV-1 Vpr: Identification of determinants essential for subcellular localization. *Virol.* 212:331-339.
- Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995b) Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation. *Virology* 207:297-302.
- Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Murali, R.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995c) Mutagenesis of the putative  $\alpha$ -helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92:3794-3798.
- Mahalingam, S.; Patel, M.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995d) The carboxy-terminal domain is essential for stability and not for virion incorporation of HIV-1 Vpr into virus particles. *Virology* 214:647-652.
- Marlim, M.H.; Hauber, J.; Le, S.-Y.; Maizel, J.V.; Cullen, B.R. (1989) The HIV-1 Rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254-257.
- Martin, M.A. (1993) The molecular and biological properties of the human immunodeficiency virus. In: "The molecular basis of blood diseases" Stamatoyannopoulos, Neinhuis, Majerus, Varmus eds. W.B. Saunders Company.
- Nie, Z.; Bergeron, D.; Subbramanian, R.A.; Yao, X.-J.; Checroune, F.; Rougeau, N.; Cohen, E.A. (1998) The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocalization of proviral DNA in growth-arrested cells. *J. Virol.* 73:4104-4115.
- O'Brien, W.A.; Koyanagai, Y.; Namazie, A.; Zhao, J.Q.; Diagne, A.; Idler, K.; Zack, J.A.; Chen, J.S.Y. (1990) HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4 binding domain. *Nature (London)* 348:69-73.
- Ogawa, K.; Shibata, R.; Kiyomasu, T.; Higuchi, I.; Kishida, Y.; Ishimoto, A.; Adachi, A. (1989) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus *vpr* open reading frame. *J. Virol.* 63:4110-4114.
- Parillo, J.E.; Fauci, A.S. (1979) Mechanisms of glucocorticoid action on immune processes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19:179-201.
- Paxton, W.; Connor, R.I.; Landau, N.R. (1993) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of *gag* and mutational analysis. *J. Virol.* 67:7229-7237.
- Piller, S.C.; Ewart, G.D.; Premkumar, A.; Cox, G.B.; Gage, P.W. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:111-115.

Planelles, V.; Jowett, J.B.M.; Li, Q.X.; Xie, Y.; Hahn, B.; Chen, I.S.Y. (1996) Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J. Virol.* 70:2516-2524.

Schüler W., Wecker K., de Rocquigny H., Baudat Y., Sire J., Roques B. P. (1999) NMR Structure of the (52-96) C-terminal Domain of the HIV-1 Regulatory Protein Vpr: Molecular Insights into its Biological Functions. *J. Mol. Biol.* 285:2105-2117.

Rafaeli, Y.; Levy, D.N.; Weiner, D.B. (1995) The glucocorticoid receptor type II complex is target of HIV-1 vpr gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3621-3625.

Rafaeli, Y. (1994) Recombinant HIV-1 Vpr protein induces cellular differentiation in vitro. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 18B p.140, abstract J 262.

Re, F.; Braaten, D.; Franke, E.K.; Luban, J. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34<sup>cdc2</sup>-cyclin B. *J. Virol.* 69:6859-6864.

de Rocquigny, H.; Petitjean, P.; Tanchou, V.; Decimo, D.; Drouot, L.; Delaunay, T.; Darlix, J.-L.; Roques, B.P. (1997) The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J. Biol. Chem.* 272(49): 30753-30759.

Rogel, M.; Wu, L.I.; Emerman, M. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* 69:882-888.

Roques, B.P.; Morellet, N.; de Rocquigny, H.; Déméné, H.; Schueler, W.; Jullian, N. (1997). Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie* 79:673-680.

Schubert, U.; Clouse, K.A.; Strebel, K. (1995) Augmentation of virus secretion by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is cell-type-independent and occurs in cultured human primary macrophages and lymphocytes. *J. Virol.* 69:7699-7711.

Shibata, R.; Adachi, A.; Sakai, H.; Sakai, H.; Miura, T.; Miura, T. (1990) Mutational analysis of simian immunodeficiency virus from african green monkeys and human immunodeficiency virus type 2. *J. Med. Primatol.* 19:217-225.

Shibata, R.; Miura, T.; Miura, T.; Ogawa, K. K.; Sakai, H.; Kiyomasu, T.; Sakai, H.; Adachi, A. (1990) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) genome in relation to HIV-1 and simian immunodeficiency virus SIV<sub>AGM</sub>. *J. Virol.* 64:742-747.

Shioda, T.; Levy, J.A.; Cheng-Mayer, C. (1991) Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature (London)* 349:167-169.

Stevenson, M.I. (1996) Portals of entry: uncovering HIV nuclear transport pathways. *Trends Cell Biol.* 6:9-15.

Stivahtis, G.L.; Soares, M.A.; Vodicka, M.A.; Hahn, B.M.; Emerman, M. (1997) Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *J. Virol.* 71:4331-4338.

Strebel, K.; Klimkait, T.; Martin, M.A. (1988) A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241:1221-1223.

Subbramanian, R.A.; Yao, X.-J.; Dilhuydy, H.; Rougeau, N.; Bergeron, D.; Robitaille, Y.; Cohen, E.A. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein

modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity. J. Mol. Biol. 278:13-30.

Theodore, T.S.; Englund, G.; Buckler-White, A.; Buckler, C.E.; Martin, M.A.; Peden, K.W. (1996) Construction and characterization of a stable full-length macrophage-tropic HIV type 1 molecular clone that directs the production of high titers of progeny virions. AIDS Res. Hum. Retrovir. 12:191-194.

Tristem, M.; Marshall, C.; Karpas, A.; Hill, F. (1992) Evolution of the primate lentiviruses: evidence from *vpx* and *vpr*. EMBO J. 11:3405-3412.

Trono, D. (1995) HIV Accessory Proteins: leading roles for the supporting cast. Cell 82:189-192.

Tung, H.Y.; de Rocuigny, H.; Zhao, L.-J.; Cayla, X.; Roques, B.P.; Ozon, R. (1997) Direct activation of protein phosphatase-2A<sub>α</sub> by HIV-1 encoded protein complex NCp7:vpr. FEBS Letters 401:197-201.

Von Knebel Doberitz, M. (1990) Glucocorticoid hormones reduce the expression of major histocompatibility class I antigens on human epithelial cells. Eur.J.Immunol. 20:35-40.

Wang, B.; Ge, Y.C.; Palasanthiran, P.; Xiang, S.-H.; Ziegler, J.; Dwyer, D.E.; Randle, C.; Dowton, D.; Cunningham, A.; Saksena, N.K. (1996) Gene defects clustered at the C-terminus of the *vpr* gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: *in vivo* evolution of *vpr* quasispecies in blood and plasma. Virol. 223:224-232.

Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O.; Zhao, L.-J. (1996) Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. Gene 178:7-13.

Wang, L.; Mukherjee, S.; Jia, F.; Narayan, O.; Zhao, L.-J. (1995) Interaction of virus protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. J. Biol. Chem. 270:25564-25569.

Westervelt, P.; Henkel, T.; Trowbridge, D.D.; Orenstein, J.; Heuser, J.; Gendelman, H.; Ratner, L. (1992) Dual regulation of silent and productive infection in monocytes by distinct human immunodeficiency virus type 1 determinants. J. Virol. 66:3925-3931.

Willey, R.L.; Smith, D.H.; Lasky, L.A.; Theodore, T.S.; Earl, P.L.; Moss, B.; Capon, D.J.; Martin, M.A. (1988) In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. J. Virol. 62:139-147.

Wong-Staal, F.; Chanda, P.K.; Ghayeb, J. (1987) Human immunodeficiency virus: the eighth gene. AIDS Res.Hum.Retroviruses 3:33-39.

Withers-Ward, E.S.; Jowett, J.B.; Stewart, S.A. Xie, Y.M.; Garfinkel, A.; Shibagaki, Y.; Chow, S.A.; Shah, N.; Hanaoka, F.; Sawitz, D.G. Armstrong, R.W.; Souza, L.M.; Chen, I.S. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. J. Virol. 71:9732-9742.

Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284:555-556.

Yao, S.; Azad, A.A.; Macreadie, I.G.; Norton, R.S. (1998) Helical structure of polypeptides from the C-terminal half of HIV-1 Vpr. Protein and Peptide Letters 5:127-134.

Yao, X.-J.; Subbramanian, R.A.; Rougeau, N.; Boisvert, F.; Bergeron, D.; Cohen, E.A. (1995)

Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* 69: 7032-7044.

Yuan, X.; Matsuda, Z.; Matsuda, M.; Essex, M.; Lee, T.H. (1990) Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS Res. Human. Retroviruses* 6:1265-1271.

5 Zhao, L.J.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994a) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* 269:15577-15582.

Zhao, L.J.; Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994b) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: oligomerization by the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269:32131-32137.

10 Zhao, Y.; Cao, J.; O'Gorman, M.R.; Yu, M.; Yogev, R. (1996) Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Virol.* 70:5821-5826.

### Legende zu den Figuren

#### Figur 1: Struktur- und Funktionsdomänen in Vpr

Folgende Primär- und Sekundär-Strukturelemente in Vpr sind der Aminosäuresequenz des Proteins Vpr von HIV-1NL4-3 zugeordnet: negativ geladener N-Terminus (Markierung (1), Positionen 1-17); Helix alpha-1 (Markierung (2), Positionen 18-37); eine nicht näher definierte Region (Markierung (3), Positionen 38-51); Helix alpha-2 (Markierung (4), Positionen 51-76); basischer C-Terminus (Markierung (8), Positionen 77-96). Überlappend dazu sind weitere Bereiche angezeigt: eine Leuzin- und Isoleuzin-reiche Region, welche auch als Leuzin-Zipper-ähnlich oder auch "LR-Domäne" bezeichnet wird (Markierung (5), Positionen 60-80); eine Region, welche das sich wiederholende Motiv "HF/SRIG" enthält (Markierung (6), Positionen 71-82); den vermutlichen Transmembrananker von Vpr, welcher notwendig für die Ionenkanalaktivität von Vpr ist (Markierung (7), Positionen 52-79).

#### Figur 2: Immunologische Reaktivität von polyklonalen Antikörpern spezifisch für sVpr1-96 im Westernblot und Immunpräzipitation

Serum von Kaninchen immunisiert mit sVpr1-96, R-96, wurde in Westernblot (A) und Immunpräzipitation (B) getestet. Eine Verdünnungsreihe von 0.01 bis 10 ng sVpr1-96 wurde im SDS-PAGE (12.5% Acryl aide Gel) aufgetrennt (A). Eine ähnliche Verdünnungsreihe an sVpr1-96 wurde mit humanen Serum versetzt, und aus diesem Gemisch wurde mittels dem Serum R-96 das Peptid sVpr1-96 durch Immunpräzipitation isoliert, und nachfolgend ebenfalls im SDS-PAGE aufgetrennt (B). Nach Elektrotransfer auf PVDF-Membranen wurde sVpr1-96 mittels R-96 Antikörpern sowie anschließender Bindung von <sup>125</sup>I-Protein G detektiert. Das Autoradiogramm einer 2-Tage-Exposition ist in (A) und (B) dargestellt. Die Positionen von Molekulargewichtsstandardproteinen sind auf der linken Seite, sowie die Positionen von unspezifischen Reaktion mit der schweren (hc) und leichten Kette (lc) der zur Immunpräzipitation eingesetzten Immunglobuline ist auf der rechten Seite angezeigt.

**Figur 3: sVpr1-96 aktiviert Virusreplikation und erhöht Zahl lebender Zellen in Kulturen von humanen PBMC**

Kulturen von PHA- und IL-2-aktivierte PBMCs wurden mit gleichen infektiösen Dosen folgender Virusstocks infiziert: HIV-1NL4-3 (A,B,C), NL4-3(AD8) (D) sowie der *vpu*-defizienten Mutante NL(AD8)-UDEL1 (E) und der *vpr*-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR (F). Während des Infektionsexperimentes wurden die Kulturen in Gegenwart von 10 nM sVpr1-96 oder 10 nM des Kontrollpeptides Vpu32-81 kultiviert. Die Virusfreisetzung ist als Profil der Virus-assoziierten RT-Aktivität im Zellkulturüberstand dargestellt (A,C,D,E,F). (B) zeigt die Zahl der lebenden Zellen im Experiment von (A).

**Figur 4: sVpr1-96 aktiviert die Replikationskompetenz von *vpr*-defizienten HIV-1 Mutanten in Kulturen von primären humanen Monozyten/Makrophagen isoliert von verschiedenen Donoren**

Parallele Kulturen von ausdifferenzierten MDM-Isolaten gewonnen, von drei verschiedenen Donoren, wurden mit gleichen infektiösen Dosen von gereinigten Virusstocks des Makrophagen-tropen Virus NL4-3(AD8) sowie dessen *vpr*-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR infiziert. Die Virusproduktion wurde über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten verfolgt und als Virus-assoziierte RT-Aktivität gegen die Zeit aufgetragen.

**Figur 5: 2D 1H TOCSY Spektrum**

(Mischungszeit = 110 ms) einer 2 mM-Lösung of sVpr1-96 in 1:1 (V/V) TFE-d2/H2O bei 300°K.

Die Ordinate und Abzisse zeigen die entsprechenden 1D 1H Spektren. Vergrößerungen der Regionen A, B und C werden in Figur 6 gezeigt.

**Figur 6:**

Vergrößerte Regionen der 2D TOCSY Spektren, dargestellt in Figur 5, welche den Wechselwirkungen zwischen den Protonen H-7 und H-2 von Tryptophanresten (A); H-2 und H-4 von Histidinresten (B), und epsilon-H und alpha-H von Argininresten (C) entsprechen.

## Patentansprüche

1. Verwendung von synthetischen (s) Peptiden des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) Humaner Immundefizienzviren (HIV) zu therapeutischen und/oder diagnostischen Zwecken.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich

a) um ein synthetisches (s) Vpr-Protein (sVpr1-96) mit 96 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-  
Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-  
Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-  
Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-  
Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH,

oder

b) um ein N-terminales Peptid (sVpr1-47) mit 47 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-  
Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-  
Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-NH<sub>2</sub>,

oder

c) um ein C-terminales Peptid (sVpr48-96) mit 49 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-  
Leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-  
Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH,

oder

d) um ein Peptid (sVpr1-20) mit 20 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>,

oder

e) um ein Peptid (sVpr21-40) mit 20 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>

oder

f) um ein Peptid (sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>)) mit 20 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Asn-Glu-Asp-Gln-Gly-Asn-Gln-Arg-Glu-Asn-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>

oder

g) um ein Peptid (sVpr21-40(Asn<sup>35</sup>)) mit 20 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:  
H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub> oder

h) um ein Peptid (sVpr11-25) mit 15 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:  
Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu- oder

i) um ein Peptid (sVpr41-55) mit 15 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:  
Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala oder

j) um ein Peptid (sVpr46-60) mit 15 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:  
Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile- oder

k) um ein Peptid (sVpr66-80) mit 15 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:  
Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg oder

l) um ein Peptid (sVpr76-96) mit 21 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:  
Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

handelt.

3. Verwendung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um sVpr-Proteine handelt, in denen die N-terminale Domäne der sVpr-Proteine in einem, mehreren oder allen vier Prolin-Reste mutiert ist.

4. Verwendung nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung von poly- und monoklonalen Vpr-spezifischen Antikörpern oder Antiseren.

5. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4 zur Gewinnung von Epitop-differenten Vpr-spezifischen Antikörpern.

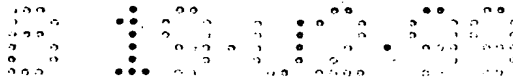
6. Verwendung von Antikörpern nach Anspruch 4 und 5 in serologischen Testverfahren.

7. Verwendung nach Anspruch 4 bis 6 in einem Vpr-Antigen(Ag)-ELISA.

8. Verwendung nach Anspruch 1 und 7 zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung von viralem Vpr im Blut HIV-infizierter Individuen.

9. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1 bis 8 als Standard-Antigen für die Eichung von





46

## Vpr-Ag-ELISA-Techniken.

10. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1 bis 3 für *in vitro* Testsysteme zur Bestimmung von Vpr-Antagonisten.

5

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Komplementierung der Funktion von endogenen, viralen Vpr in Zellkulturen, die mit *vpr*-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

10

12. Verwendung nach Anspruch 10 und 11 zur Komplementierung der Funktion von viralem Vpr in Kulturen von primären humanen Lymphozyten, die mit *vpr*-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

13. Verwendung nach Anspruch 10 und 11 zur Komplementierung der Funktion von viralen Vpr in Kulturen von ausdifferenzierten primären humanen Monozyten / Makrophagen, die mit *vpr*-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

14. Verwendung nach Anspruch 10 bis 13 zur Bestimmung von Reagenzien, die

20

a) die Wechselwirkung von Vpr mit zellulären Faktoren, wie zum Beispiel mit dem Glucocorticoid-Rezeptor, Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-interagierenden Enzymen und Faktoren unterbinden;

b) die Transkriptions-aktivierende Wirkung von Vpr verhindern;

c) die Aktivität von Vpr auf die Wirkung von Steroidhormone regulieren, beeinflussen oder verhindern;

25

d) den Transport von Vpr allein oder im Verbund mit anderen Komponenten des HIV-Präintegrationskomplexes regulieren, beeinflussen oder verhindern;

e) den Einbau von Vpr in Viruspartikel während der HIV-Assemblierung regulieren, beeinflussen oder verhindern;

f) den Vpr-induzierten Zellzyklusarrest regulieren, beeinflussen oder verhindern

30

g) den Effekt von Vpr auf Zelldifferenzierung und Zellwachstum regulieren, beeinflussen oder verhindern

h) die zytotoxischen Effekte von Vpr regulieren, beeinflussen oder verhindern

i) die Ionenkanalaktivität von Vpr regulieren, beeinflussen oder verhindern

35

15. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1 bis 3 für *in vivo* Testsysteme zur Bestimmung von Vpr-Antagonisten.

16. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1,2,3 und 15 in Tiermodellstudien zur

43

Bestimmung von Funktionen nach Anspruch 14.

17. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung konzentrierter Peptid-Lösungen.

18. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1,2,3 und 17 zur Herstellung spezifischer Vpr-Antagonisten.

19. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1,2,3,17 und 18 zur Reduktion der durch die N-terminale Domäne von Vpr induzierten Flexibilität von sVpr-Protein mittels strukturstabilisierenden Faktoren.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den strukturstabilisierenden Faktoren um

- a) die UBA2-Domäne des DNA-Reparaturproteins HHR23A, welches an Vpr bindet,
- b) Fab-Fragmente von Vpr-spezifischen Immunglobulinen oder
- c) virale Faktoren, insbesondere Komponenten des HIV-1 Gag-Polypoteinprecursurs Pr55<sup>Gag</sup>, welche im Prozess der Virus-Assemblierung mit Vpr in Verbindung treten, dem humanen Glucocorticoidrezeptor oder Bestandteile davon handelt.

21. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1 bis 3 für *in vitro* Assemblierung von retroviralen Präintegrationskomplexen.

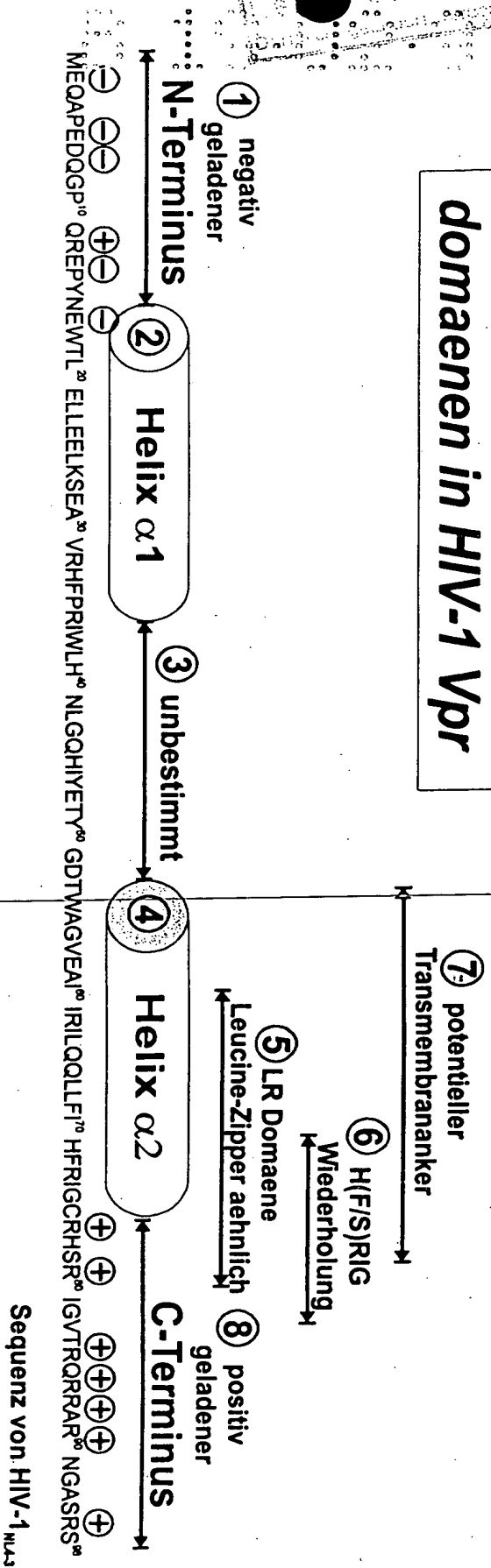
22. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1,2,3 und 21 in *in vitro* oder *in vivo* applizierbaren Gentransfermethoden.

23. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1,2,3,21 und 22 für Transfektionen, Integration in chromosomale und episomale Wirts-DNA oder andere Gentransfermethoden in eukaryotischen Zellen.

24. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 1,2,3,21 und 22 für Gentransfers von *in vitro* hergestellter und/oder manipulierter Genfragmente in Zellen, Gewebe oder Organismen mit dem Zweck einer gentherapeutischen Applikation.

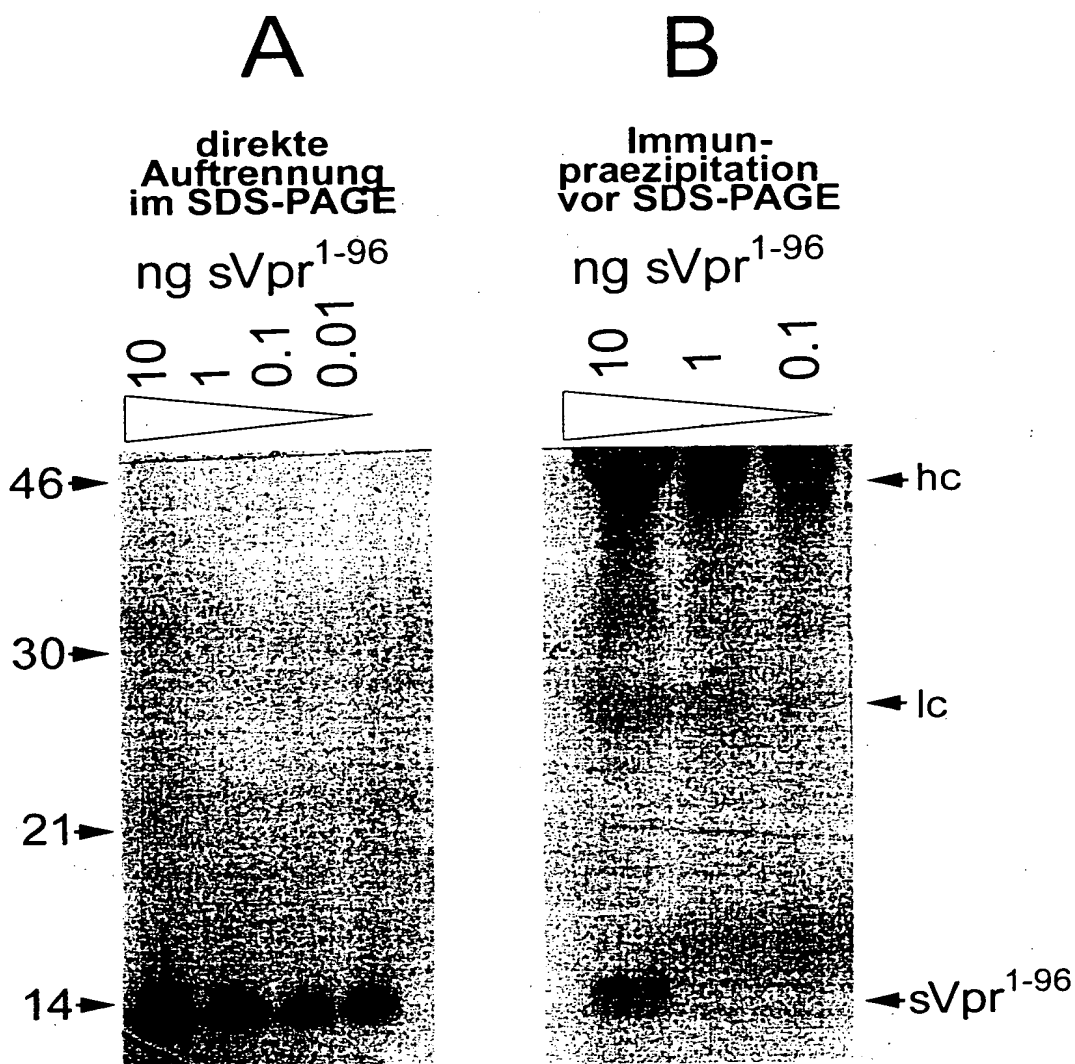
Figur 1

# Struktur- und Funktionsdomaenen in HIV-1 Vpr

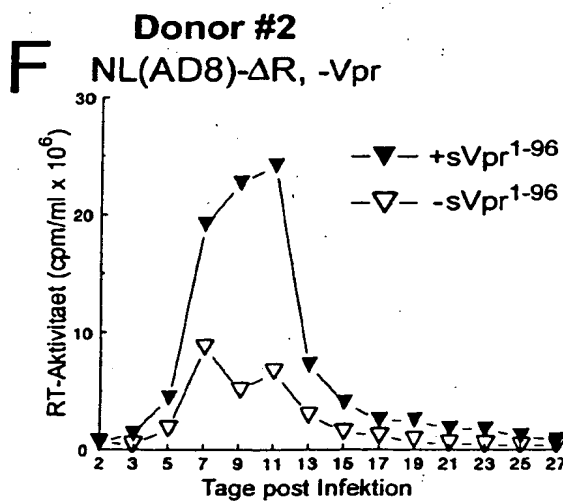
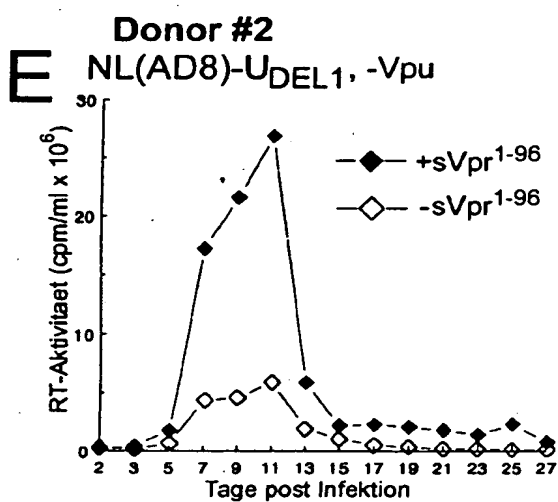
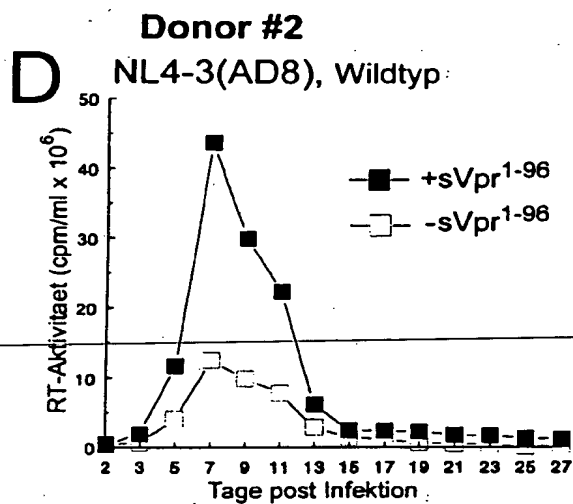
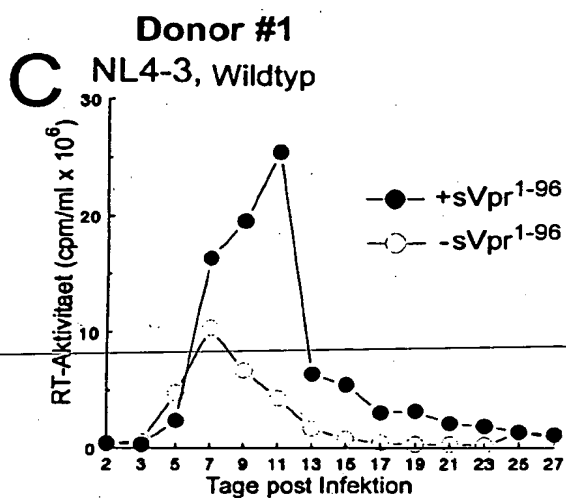
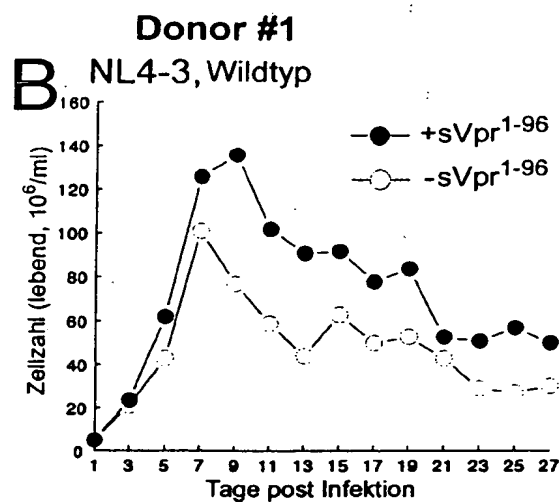
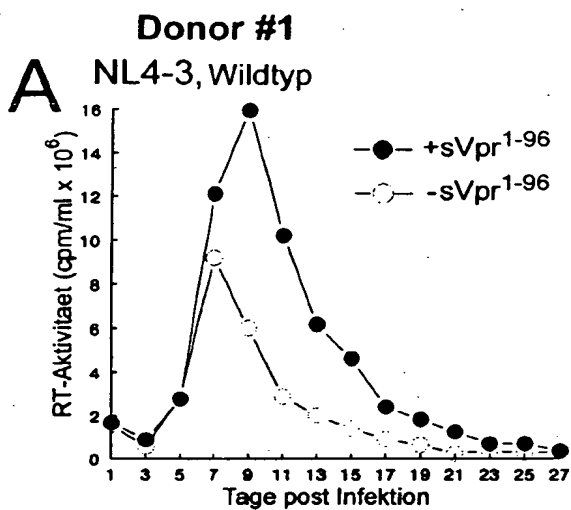


Domäne	Funktionen
② ④	Einbau von Vpr in Viruspartikel
② ④ ⑤	Transport in Zellkern
② ② ④	Zellzyklus-Arrest/Zelldifferenzierung
① ② ③	Oligomerisierung
⑥ ⑧	Zytotoxizität und Induktion von Apoptosis
④ ⑧	Ionenkanalaktivität
⑤ ⑧	Transkriptionsaktivierung & Interaktion mit Sp1
④ ⑤	Regulation des Glucocorticoidrezeptors

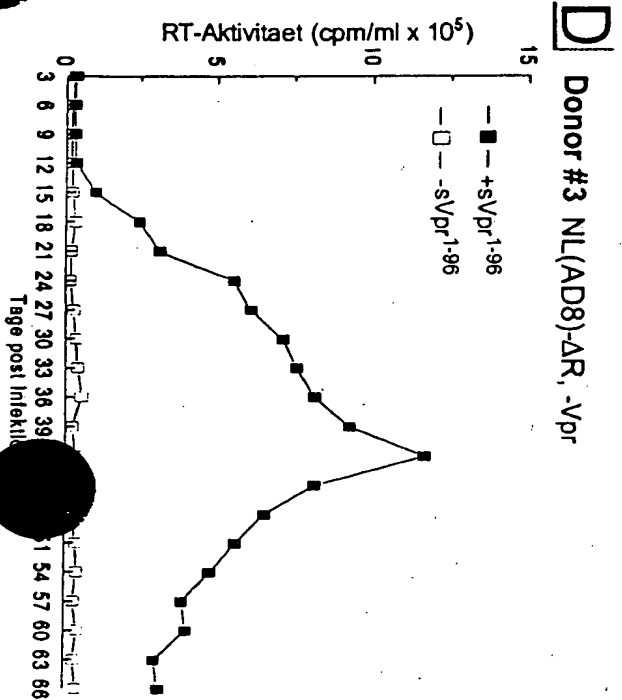
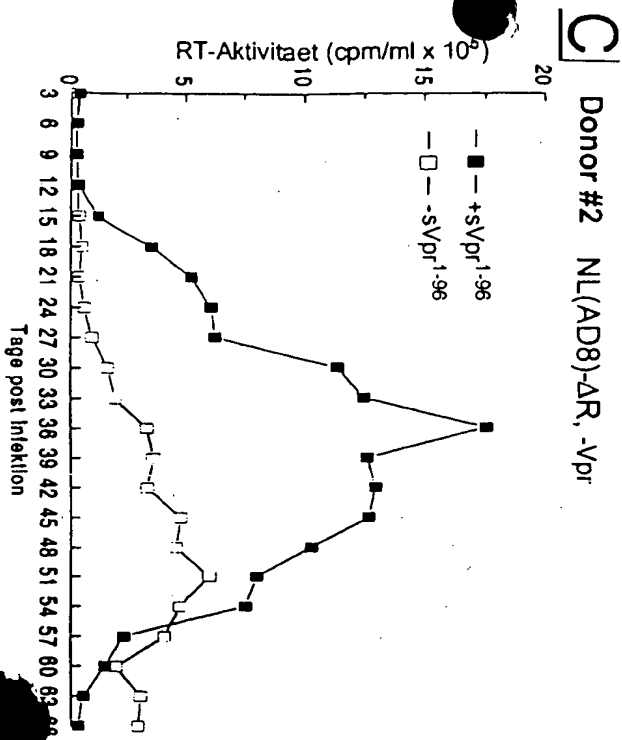
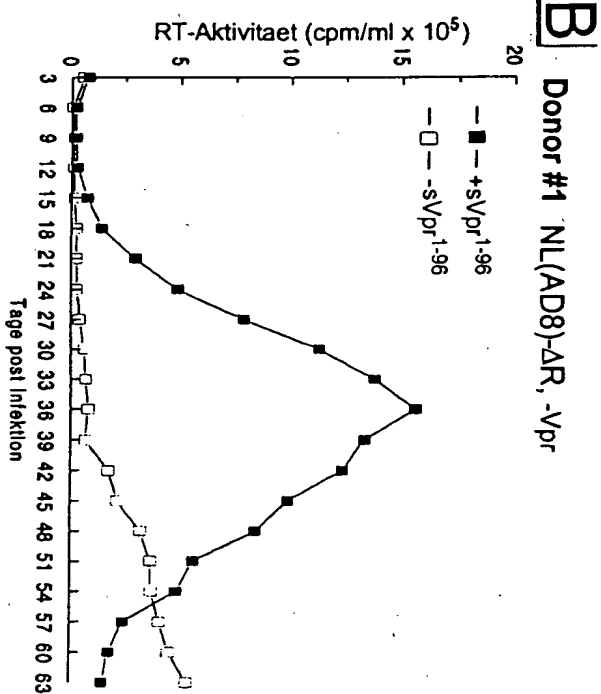
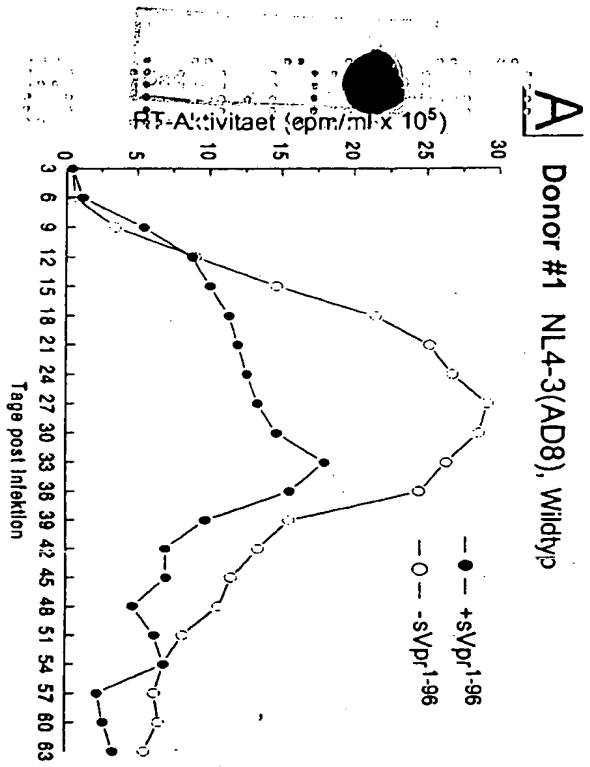
Figur 2



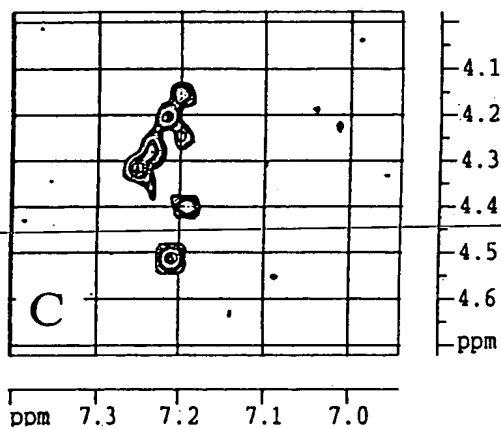
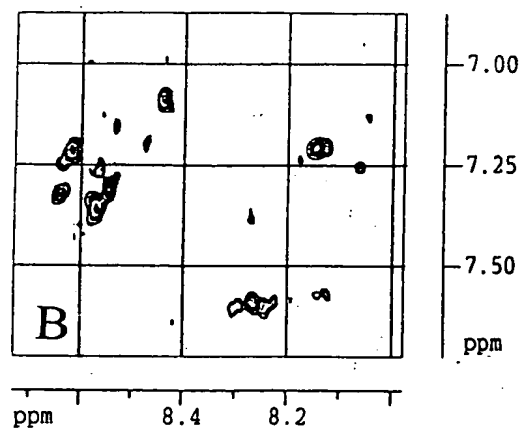
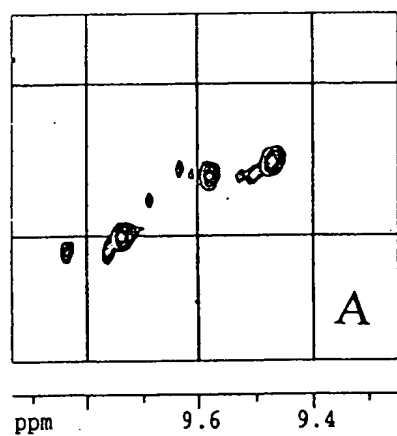
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

